



**DESNUTRIÇÃO NEONATAL:
ASPECTOS ESTRUTURAIS E BIOMECÂNICOS DO
DESENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS**

KARLA MÔNICA FERRAZ TEIXEIRA DE BARROS

RECIFE

2006

KARLA MÔNICA FERRAZ TEIXEIRA DE BARROS

**DESNUTRIÇÃO NEONATAL:
ASPECTOS ESTRUTURAIS E BIOMECÂNICOS DO
DESENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS**

Tese realizada em Co-Tutela com a Université de Technologie de Compiègne – UTC, 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

2006

Barros, Karla Mônica Ferraz Teixeira de
Desnutrição neonatal: aspectos estruturais e
biomecânicos do desenvolvimento da atividade
locomotora em ratos / Karla Mônica Ferraz Teixeira
de Barros. – Recife : O Autor, 2006.

147 folhas ; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição neonatal. 2. Desnutrição precoce –
Desenvolvimento. 3. Biomecânica muscular. I.
Título.

612.394
591.3

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

UFPE
CCS2007-46

DESNUTRIÇÃO NEONATAL:

ASPECTOS ESTRUTURAIS E BIOMECÂNICOS DO DESENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS

KARLA MÔNICA FERRAZ TEIXEIRA DE BARROS

Tese Apresentada e Aprovada em 13 de Dezembro de 2006

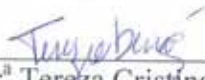
Banca Examinadora:



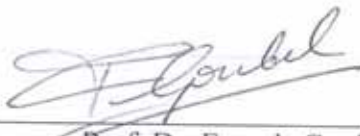
Prof.ª Dr.ª Carol Virgínia Góes Leandro



Prof. Dr. Marco Aurélio Benedetti Rodrigues



Prof.ª Dr.ª Tereza Cristina B. de Jesus Deiró



Prof. Dr. Francis Goubel



Prof. Dr. Francis Canon



ORIENTADOR

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

CO-ORIENTADOR

Doutor FRANCIS CANON, Maître de Conférences do Departamento de Génie Biologique, UMR 6600, Université de Technologie de Compiègne (UTC) – França.



Este trabalho foi financiado pela CAPES.

Mensagem

Ainda que eu fale a língua dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine. Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

O amor é paciente, benigno.

O amor jamais acaba; mas, havendo profecias, desaparecerão; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, passará.

Agora, pois, permanecem a esperança, a fé e o amor; destes, o maior é o amor.

(1º Coríntios, 13)

Dedicatória

É sempre fácil lembrar daqueles a quem se ama.
E é maravilhoso descobrir que se está rodeado
de pessoas a quem amamos.

Considero um privilégio ter vivido sentindo
sempre o amor de Deus, através da família e dos
amigos que Ele me deu de presente!

À minha família, em especial à minha mãe RUTH e
meus filhos
BRENO, TÚLIO E FLÁVIA.

A todos os companheiros de nosso grupo de
pesquisa, além de nossas relações de trabalho,
creio que formamos uma verdadeira família,
cheia de amor e respeito.

Agradecimentos

- ◆ Ao meu orientador, Raul Manhães de Castro: após dez anos de convivência, é bonito ver como nos tornamos amigos! Muito obrigada pelo apoio incondicional, pela compreensão, confiança! Foi com você que desenvolvi o amor pela pesquisa!
- ◆ Ao meu co-orientador, Francis Canon: desde o primeiro momento, ao chegar na UTC, estive comigo, ensinando com paciência tantos procedimentos novos para mim e demonstrando muita atenção e cuidado. Nessa fase final, devo a ele a finalização da redação, conduzida com muito trabalho e detalhe, e com várias demonstrações de amizade! Muito, muito obrigada!
- ◆ A Francis Goubel: não tenho receio de dizer que a convivência com essa pessoa extraordinária modificou a minha maneira de ver a vida! É uma honra ter compartilhado com ele momentos de trabalho e lazer, mais ainda tê-lo como membro da banca examinadora.
- ◆ Àquelas pessoas que tornam a vida mais agradável, pelo simples fato de serem queridas: Tereza Mendonça, Lu, Osman, Fabiana, Joaquim, Rozeli, tia Fila, Kátia, Carol, Rogério, Daniel... conversas indispensáveis, ombros disponíveis, apoio sempre! Agradeço a Deus pelas suas vidas!
- ◆ À família NNI: que Deus permita que continuemos a crescer juntos, cultivando nossa amizade e trabalho. Não se enganem: temos a rara oportunidade de trabalhar com quem gostamos, e isso é dom!
- ◆ A Neci Nascimento e Lúcia Pires: não só pela competência profissional, mas por todo o carinho!
- ◆ Ao Dr. França, por toda a atenção durante os trabalhos experimentais.
- ◆ À equipe da Université de Technologie de Compiègne: a forma como fui bem acolhida naquela instituição será sempre lembrada com carinho! Conheci pessoas intressantíssimas, e gostaria de destacar entre elas Clotilde Vanhoute e Chantal Pérot, que já possuem uma longa caminhada, e manifestam um entusiasmo de quem está começando a sua carreira! Reconheço o privilégio de ter recebido delas uma atenção toda especial. Muito obrigada!
- ◆ À CAPES, que através do financiamento ao nosso projeto, me permitiu viver uma experiência incrível de mudança e conhecimento, na ciência e na vida!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

RESUMO

ABSTRACT

RESUME

I. INTRODUÇÃO <i>(avec résumé en Français)</i>	01
1.1 Desenvolvimento dos sistemas nervoso e muscular	05
1.1.1 <u>Sistema Nervoso: desenvolvimento precoce e organização de movimentos</u>	05
1.1.2 <u>Sistema Muscular: desenvolvimento precoce, organização estrutural e funcional</u>	11
1.2 Repercussões de agressões durante o período de desenvolvimento	30
II. OBJETIVOS <i>(avec résumé en Français)</i>	35
III. HIPOTHESES <i>(avec résumé en Français)</i>	37
IV. BASES FUNCIONAIS DA ATIVIDADE LOCOMOTORA:	39
Estudos sobre o desenvolvimento e eventuais conseqüências da desnutrição precoce	
4.1 Estudo da maturação de reflexos <i>(avec résumé en Français)</i>	39
4.1.1 <u>Animais e grupos experimentais</u>	41
4.1.2 <u>Material e Métodos de avaliação da Maturação dos Reflexos</u>	42
4.1.3 <u>Análise dos Resultados</u>	47
4.1.4 <u>Discussão</u>	50
4.2 Estudo do desenvolvimento neonatal da atividade locomotora	53
<i>(avec résumé en Français)</i>	
4.2.1 <u>Obtenção dos animais e Grupos Experimentais</u>	56

4.2.2 <u>Material e Métodos para Avaliação da Atividade Locomotora</u>	57
4.2.3 <u>Análise dos Resultados</u>	62
4.3.4 <u>Discussão</u>	66
4.3 Estudo do desenvolvimento neonatal e das adaptações do tecido muscular esquelético	71
<i>(avec résumé en Français)</i>	
4.3.1 <u>Obtenção dos Animais e Grupos Experimentais</u>	77
4.3.2 <u>Material e Métodos de Avaliação Biomecânica</u>	78
4.3.3 <u>Material e Métodos para Análise Histoquímica</u>	84
4.3.4 <u>Análise dos Resultados</u>	85
4.3.5 <u>Discussão</u>	97
V. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	112
<i>(avec résumé en Français)</i>	
PERSPECTIVAS	121
<i>(avec résumé en Français)</i>	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

ANEXOS: Publicações realizadas durante o período da tese

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔP e ΔL : variações de tensão (p:força) e de comprimento (L:longueur)

AL: atividade locomotora

AP: reflexo de aversão ao precipício

ASTF: área de secção transversa fisiológica

CC: Componente Contrátil

CEP: Componente Elástico em Paralelo

CES: Componente Elástico em Série

CT: Tempo de Contração, *contraction time*

CV: reflexo de colocação pelas vibrissas

D: Desnutrido

DBR: Dieta Básica Regional

Dmax: extensão máxima

EDL: músculo extensor longo dos dedos (*extensor digitorum longus*)

EMG: Eletromiografia

F/pM: Tensão passiva relativizada quanto ao peso do músculo

F_d: Força dinâmica, durante o estiramento passivo

F_s : Força estática, durante o estiramento passivo

GN: reflexo de geotaxia negativa

HRT: tempo necessário para se atingir 50% do relaxamento após o pico de contração (*Half Relaxation Time*).

L₀ : comprimento ótimo no músculo isolado

L_s : comprimento *Slack* (momento em que o músculo não estimulado começa a desenvolver tensão ao estiramento),

M: massa do animal

mATPase: ATPase miofibrilar cálcio-ativada

MHC: Myosin Heavy Chain

MLC : Myosin Light Chain

N: Normonutrido

P: força obtida no momento de liberação rápida do comprimento muscular, durante o teste de *controlled release*

P_0/M : tensão tetânica relativizada quanto ao peso muscular

P_0 : Força obtida durante o platô tetânico

PP: reflexo de preensão palmar

Pt: força máxima durante o twitch

QL: reação de endireitamento em queda livre ().

RD: reflexo de recuperação de decúbito

RS: reflexo de resposta ao susto

SN: Sistema Nervoso

V: velocidade

V_0 : Velocidade Máxima de Encurtamento em fibra muscular

V_{max} : Velocidade Máxima de Encurtamento do músculo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS :

Figura 1: Modelo muscular a três componentes (pag 20)

Figura 2: Curva hiperbólica típica na Relação Tensão- Extensão (pag 22)

Figura 3 : Relação Típica Força-Velocidade, linearizada. Ponto de intersecção = Velocidade Máxima de Encurtamento (V_{max}) (pag 22)

Figura 4 – Procedimento para avaliação do reflexo de preensão palmar (PP). (pag 43)

Figura 5 - Procedimento para avaliação do reflexo de Recuperação do Decúbito (RD). (pag 44)

Figura 6 – Procedimento para avaliação do reflexo de Colocação pelas Vibrissas (CV). (pag 44)

Figura 7 – Procedimento para avaliação do reflexo de Aversão ao Precipício (AP). (pag 45)

Figura 8 - Procedimento para avaliação do reflexo de Geotaxia Negativa (GN). (pag 46)

Figura 9 - Procedimento para avaliação do reflexo de Resposta ao Susto. (pag 46)

Figura 10 – Procedimento para avaliação da Reação de Endireitamento em Queda livre. (pag 47)

Figura 11: Efeitos da desnutrição neonatal sobre o ganho de peso corporal (pag 49)

Figura 12: Câmera utilizada para o registro de imagens e representação esquemática do sistema de monitoramento da atividade locomotora em pequenos animais (pag 59)

Figura 13: Sequência de imagens utilizadas no registro da Atividade Locomotora. (pag 62)

Figura 14 – Evolução ponderal durante o período de aleitamento, durante a avaliação da AL, no 8º, 14º, 17º e 21º dias pós-natais. (pag 62)

Figura 15.– Evolução da distância percorrida (m) durante a avaliação da AL. (pag 63)

Figura 16: Evolução da Velocidade Média (D) durante a avaliação da AL. (pag 64)

Figura 17: Evolução da Potência Média durante a avaliação da AL. (pag 65)

Figura 18.: Duração do Tempo em que o animal permaneceu parado durante a avaliação da AL. (pag 65)

Figura 19: Número de paradas apresentado durante a avaliação da AL. (pag 66)

Figura 20: Representação esquemática dos componentes do ergômetro para avaliação do músculo isolado. (pag 79)

Figura 21 : Curva típica de força obtida para a relação força/ velocidade, durante o teste de *double controled release* (pag 80)

Figura 22 : Representação gráfica do traçado obtido durante o teste de Twitch (pag 81)

Figura 23 - Representação esquemática do Teste de Relaxamento. (pag 82)

Figura 24 - Representação esquemática do Teste de Estiramento Quase Estático. (pag 83)

Figura 25: Evolução dos pesos musculares nos músculos solear e EDL em ratos aos 25 e 90 dias de idade, normo (N) ou desnutridos (D). (pag 87)

Figura 26: Evolução dos pesos musculares relativos nos músculos solear e EDL em ratos aos 25 e 90 dias de idade, normo (N) ou desnutridos (D). (pag 87)

Figura 27 : Velocidade Máxima de Encurtamento (V_{max}) . (pag 92)

Figura 28 - Curvas típicas da relação Tensão-Extensão, obtidas em músculos solear de rato à idade de 25 dias. (pag 93)

TABELAS:

Tabela 1: Efeitos da desnutrição sobre a maturação dos reflexos: (pag 48)

Tabela 2 - Tensão do Twitch (P_t) e do tétano (P_0), tensão relativa no tétano (P_0/M), tempo de contração (CT) e tempo de meio-relaxamento (HRT). (pag 89)

Tabela 3: índice de resistência à fadiga aos 30, 60, 90 e 120 seg de teste. (pag 91)

Tabela 4 : Propriedades de tensão/extensão . (pag 94)

Tabela 5 : Teste de Relaxamento: valores absolutos e relativizados em relação ao peso muscular (F/M) de tensão passiva em resposta a um estiramento rápido de 14% a partir do L_0 (pag 95)

Tabela 6 : Teste de Estiramento em Rampa (estiramento quase-estático): força desenvolvida a 14% do estiramento imposto, em valores absolutos (F) e relativizados (F/pM) em relação ao peso dos músculos (pag 96)

RESUMO

Para avaliar os efeitos da desnutrição neonatal sobre o desenvolvimento motor, foram avaliadas a ontogênese dos reflexos, a atividade locomotora e as propriedades mecânicas dos músculos esqueléticos. Ratos Wistar foram divididos em grupos normais e desnutridos, de acordo com a dieta oferecida às lactantes durante o período de aleitamento (1° ao 21° dias pós-natais - PN). Após o desmame, os filhotes receberam dieta normal. A avaliação dos reflexos foi realizada diariamente, até o 21° PN. A atividade locomotora foi avaliada no 8°, 14°, 17° e 21° PN. A avaliação biomecânica dos diferentes componentes do músculo (contrátil/CC, elástico em série/CES e elástico em paralelo/CEP) foi realizada aos 25 e 90 PN, nos músculos solear e extensor longo dos dedos (EDL). Uma análise histoquímica (coloração ATPase) foi também realizada. A desnutrição induziu atrasos na maturação dos reflexos de aversão ao precipício, geotaxia negativa, endireitamento em queda livre, colocação pelas vibrissas e resposta ao susto. A atividade locomotora sofreu alterações devido à desnutrição: encontrou-se redução na distância e velocidade no 8° e 14° PN, seguida por um aumento aos 17 e 21 PN. O tempo de imobilidade mostrou-se reduzido nos desnutridos aos 17 e 21 PN. A análise biomecânica demonstra que a desnutrição induziu a: redução da força em ambos os músculos estudados, aumento na velocidade máxima de encurtamento aos 25 dias em ambos os músculos, aumento na resistência à fadiga no solear a 25 PN, e aumento na resistência ao estiramento passivo em ambos os músculos, aos 25 PN. Os parâmetros do CES não foram afetados. Não se observaram diferenças em relação à proporção de tipos de fibra musculares, porém a desnutrição induziu a uma redução na área de secção transversa, com exceção do EDL aos 25 PN. Os resultados permitem concluir que as modificações observadas em algumas propriedades mecânicas têm origem na desnutrição imposta no período neonatal, sendo provavelmente devidas a alterações nos processos de maturação muscular. As influências dos retardos nos processos de maturação sobre o desenvolvimento e organização da atividade locomotora são aqui discutidas.

PALAVRAS CHAVE: Desnutrição; Músculo; Biomecânica; Desenvolvimento.

ABSTRACT

To evaluate the effects of neonatal malnutrition on motor development, reflex ontogenesis, locomotor activity and mechanical properties of skeletal muscles were evaluated. Rats were divided in normal and undernourished groups, according to the diet given to dams during breastfeeding period (1st to 21st postnatal days). After weaning, rat pups fed normal diet. Reflex evaluation was made daily, until 21 postnatal day. Locomotor activity was evaluated in 8th, 14th, 17th and 21st days. Biomechanical evaluation of the different muscle component (contractile, series elastic and parallel elastic components) was accessed at 25 and 90 postnatal days, in soleus and Extensor Digitorum Longus (EDL) muscles. Histochemical analysis (ATPase staining) was also made. Malnutrition induced a delay in the reflex maturation on cliff avoidance, negative geotaxis, free-fall righting, vibrissae placing and startle reflex. Locomotor activity was changed due to undernutrition: it was found a reduction in distance and velocity at 8 and 14 days, followed by an increase at 17 and 21 days. Immobility time was decreased in malnourished rats at 17 and 21 days. Biomechanical analysis showed that malnutrition induced to: force reduction in both muscles, prolongation in contraction time and half relaxation time in 25 days old soleus, increase in maximal shortening velocity at 25 days in both muscles, increase in fatigue resistance in 25 day old soleus, and increase in stiffness in both muscles in 25 day old rats. Series Elastic Components parameters were not affected. No differences were seen in fiber type proportion, but malnutrition induced to a reduction in cross-sectional area, exception to EDL at 25 days. Modifications induced in some mechanical properties by neonatal malnutrition are probably due to an alteration in the events of the maturation processes, this period of life being a critical period for the normal development of skeletal muscle. Influences of delayed maturation and lack of organization in early age on locomotor abilities are discussed.

KEY WORDS: Malnutrition; Muscle; Biomechanics; Development.

RESUME

Ce travail vise à étudier, chez le rat, les effets de la dénutrition néonatale sur le développement locomoteur, à partir de l'évaluation de la maturation des réflexes, de l'activité locomotrice et des propriétés biomécaniques musculaires. Un groupe normonutri et un groupe dénutri sont formés à partir de la diète donnée à la mère (normale ou hypoprotéique) pendant la période de l'allaitement (1^{er} au 21^{ème} jour post-natal). Après sevrage, tous les rats ont reçu une diète normale. L'évaluation de l'ontogénèse des réflexes est fait du 1^{er} au 21^{ème} jour post-natal. L'activité locomotrice a été mesurée à 8,14, 17 et 21 jour post-natal. L'évaluation des propriétés biomécaniques des différentes composantes musculaires (composantes contractile, élastique série et élastique parallèle) s'est faite sur les muscles soléaire et Extensor Digirorum Longus, à 25 et 90 jours post-natal complétée par une analyse histochimique. La dénutrition néonatale a retardé la maturation des réflexes. Des modifications de l'activité locomotrice sont observées dans le sens d'une diminution de l'activité jusqu'à 14 jours puis d'une hyperactivité au 21^{ème} jour. Au niveau des caractéristiques biomécaniques, la dénutrition a entraîné : diminution de la force sur les deux muscles ; augmentation du temps de contraction et de demi-relaxation des soléaires à 25 jours, augmentation de la Vitesse maximale de raccourcissement à 25 jours pour les soléaires et EDL, augmentation de la résistance à la fatigue du soléaire 25 à jours, et augmentation de la raideur de la composante élastique parallèle des deux muscles à 25 jours, les caractéristiques de la Composante Elastique en Série n'étant pas modifiées. L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que la malnutrition induite pendant la phase critique de développement est à l'origine de modifications des propriétés mécaniques étudiées, modifications vraisemblablement dues à des altérations dans les processus de maturation musculaire. Les influences des retards dans les processus de maturation sur le développement et l'organisation de l'activité locomotrice sont discutées.

MOTS CLES: Dénutrition; Muscle; Biomécanique; Développement.

I. INTRODUÇÃO

RESUME EN FRANCAIS : INTRODUCTION

Dans le rapport d'un individu avec son environnement, la capacité locomotrice tiend une part prépondérante. Les comportements locomoteurs nécessitent une coordination fine et précise de diverses voies motrices en simultanée mettant en jeu l'activité intégrative du système nerveux. Celui-ci commande et intègre les actions motrices permettant les comportements volontaires et locomoteurs. L'apprentissage des comportements moteurs débute très tôt, et le système locomoteur est soumis à d'importantes modifications pendant la période de croissance et de maturation. Le muscle strié squelettique, générateur du mouvement, présente aussi une grande capacité d'adaptation pendant cette phase de croissance et de maturation.

L'objectif de cette première partie sera d'aborder les aspects structuraux et fonctionnels des systèmes nerveux et musculaire, ses rapports avec l'évolution de l'activité locomotrice et les répercussions de la dénutrition induite pendant la période critique de la croissance et du développement sur ces fonctions.

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'évolution morphologique et fonctionnelle des systèmes organiques, particulièrement pendant la période précoce de la vie. Dans le système nerveux central (SNC), les événements cellulaires sont nombreux et se produisent à grande vitesse, ce qui le rend vulnérable aux agressions. Ainsi, la période précoce de la vie est considérée comme une période critique pour le développement du SNC.

Pendant la période critique, de nombreux facteurs tant endogènes qu'exogènes, épigénétiques, peuvent modifier, moduler ou diriger le développement, sachant qu'il existe une séquence pré-déterminée dans l'évolution de chaque système organique et de ses fonctions physiologiques.

L'organisation du mouvement suit une séquence définie avec tout d'abord une réponse réflexe, un pattern moteur rythmique et des mouvements volontaires. Lors du processus de développement, ces séquences se mettent en place et il y a augmentation de la quantité du

répertoire d'actions ainsi que de la qualité de chaque action permettant l'indépendance de l'individu.

Chez le rat, la plus grande partie des événements d'organisation du SNC, ainsi que l'évolution de l'activité locomotrice, se déroulent pendant la période d'allaitement, ce qui en fait un bon modèle expérimental pour les évaluations du développement. Le rat présente un pattern bien défini dans le recrutement des muscles vis-à-vis de la construction de la posture et de la locomotion. Les mouvements alternés des pattes sont peu à peu associés à ceux du tronc, jusqu'à aboutir à un pattern similaire à celui des adultes, aux alentours de 21 jours post-natal, ce qui permet aussi de caractériser cette période comme critique pour le développement de l'activité locomotrice.

Toute influence tant sur les facteurs endogènes qu'exogènes pendant cette période critique de développement aura alors des conséquences sur les patterns posturaux et locomoteurs.

Le développement du tissu musculaire débute très tôt pendant l'embryogenèse. Chez le rat, les événements qui vont définir les propriétés structurelles et fonctionnelles du muscle se prolongent jusqu'à la fin de la période néonatale (21 jours post natal). Au sevrage, quasiment tous les éléments fonctionnels musculaires sont en place pour permettre une activité locomotrice indépendante. Même après cette phase de croissance rapide, le tissu musculaire présente une capacité de croissance et de maturation jusqu'à l'âge adulte. Quoi qu'il en soit, le muscle conserve une grande capacité d'adaptation, même après ces phases de développement et de croissance, comme l'ont démontrés les résultats des caractéristiques histologiques et mécaniques obtenues à partir de modèles d'hypo ou d'hyperactivité. Par ailleurs, il est montré le rôle important de l'activité locomotrice sur la maturation du muscle et réciproquement, l'influence de la maturation musculaire sur l'activité locomotrice.

La nutrition est un des facteurs exogènes ayant une influence importante sur le développement. Le manque de nutriments peut empêcher la croissance correcte et le développement de la plupart des fonctions organiques. Pendant cette période, les agressions nutritionnelles auront des

conséquences sur le développement cellulaire, conséquences qui entraîneront à leur tour des altérations dans les différents systèmes physiologiques, aggravant ainsi les dommages liés à la dénutrition précoce. Parmi les conséquences de la dénutrition précoce, citons des modifications des patterns moteurs et de comportement ainsi que des altérations dans le développement musculaire.

La dénutrition est encore un problème grave de santé publique dans les pays sous-développés. Plusieurs études démontrent les répercussions négatives de la dénutrition précoce sur le développement des enfants.

Dans le Nordeste du Brésil, la prévalence de la dénutrition infantile est encore importante. Dans ce cadre, il a été développé une diète expérimentale pour rongeur semblable au régime alimentaire des habitants de cette région permettant d'étudier, chez le rat, les conséquences de cette alimentation multicarencielle.

As habilidades motoras se constituem como uma das mais importantes ferramentas na relação de um ser vivo com o seu ambiente. Os comportamentos locomotores estão estreitamente relacionados à sobrevivência dos mamíferos e requerem uma coordenação fina e precisa da atividade simultânea das diversas vias motoras. Assim, através dos seus sistemas motores, é possível a um indivíduo determinar a resposta mais adequada a um determinado momento.

A atividade integrativa do Sistema Nervoso (SN) torna possível as ações que envolvem o comportamento proposicional, e depende de uma hierarquia entre os sistemas motores (Rosembaum, 1990). Dentre os mamíferos, o ser humano executa de forma particular uma extensa gama de movimentos funcionais, com alto grau de controle e grande plasticidade.

O aprendizado de comportamentos motores se inicia precocemente em quase todas as espécies e é bem estabelecido que o desenvolvimento de funções motoras encontra-se estreitamente relacionado a um desenvolvimento normal de vários sistemas orgânicos. O sistema locomotor é submetido a mudanças pronunciadas durante o decorrer da vida e o sistema muscular, como efetor primário neste conjunto, demonstra uma grande adaptabilidade.

O músculo estriado esquelético tem importante função na atividade locomotora, uma vez que desempenha um papel de gerador de força para manutenção da estabilidade articular e da postura, servindo-se dos elementos ósseos aos quais estão inseridos como braços de alavanca, ao provocar movimentos. O movimento gerado pela ação muscular, então, é devido à influência de vários componentes, o que justifica uma análise mais detalhada dos mesmos.

Obviamente, a integridade do organismo como um todo, ou seja, de todos os sistemas orgânicos, influencia a função dos sistemas nervoso e muscular no desenvolvimento e controle das habilidades motoras. Neste trabalho, serão particularmente abordados estes dois sistemas, sob seus aspectos estruturais e funcionais, assim como a possibilidades de sofrerem alguma interferência de agressões durante o seu período precoce de desenvolvimento.

1.1 Desenvolvimento dos sistemas nervoso e muscular

1.1.1 Sistema Nervoso: desenvolvimento precoce e organização de movimentos

Durante as primeiras fases do desenvolvimento, o organismo em formação pode sofrer influências de fatores ambientais, que podem potencialmente agir sobre as células progenitoras ou sobre as recém-formadas (McConnel, 1990). Os fatores que podem atuar neste período precoce irão influenciar a evolução morfofuncional dos sistemas, de modo quantitativo e qualitativo (McConnel, 1990; Purves, 1994). Assim, os eventos bioquímicos e estruturais do período de desenvolvimento são fundamentais na determinação da composição bioquímica, morfológica e funcional do organismo, em particular do SN maduro (McConnel, 1990; Gray, Leber e Sanes, 1990; Morgane et al, 1993 / 2002; Joosten e Bär, 1999).

Vale ressaltar que os eventos do crescimento e desenvolvimento ocorrem de acordo com uma seqüência temporal bem determinada (Morgane et al, 1993; Turlejski, 1996; Somogyi *et al*, 1998). Encontram-se bem caracterizados, na literatura, os processos envolvendo o SN. Neste sistema, os eventos celulares ocorrem com grande velocidade durante as suas etapas iniciais, tornando-o neste período mais vulnerável às agressões (Winick, 1969; Dobbing, 1970). Há vários indícios na literatura, demonstrando que distúrbios nesta etapa podem modificar intensamente os eventos ontogenéticos seqüenciais com efeitos diversos sobre o SN em formação (Dobbing, 1970; Lynch, Smart e Dobbing, 1975; Morgane *et al.*, 1993; Akbari, Whitaker-Azmitia e Azmitia, 1994). Desta forma, este período inicial do desenvolvimento é considerado um *período crítico do desenvolvimento* (Winick, 1969; Dobbing, 1970).

É digno de nota que períodos críticos de desenvolvimento, particularmente como demonstrado no SN, não ocorrem numa mesma seqüência temporal entre as várias espécies. No rato, por exemplo, grande parte do período crítico é pós-natal, durante a fase de aleitamento (Winick, 1969). No homem, por sua vez, este período inicia-se no terceiro trimestre do desenvolvimento intra-uterino, continuando-se por dois a quatro anos após o nascimento (Morgane *et al.*, 1978). Experimentalmente, trata-se de um período importante para a observação de conseqüências de diversos tipos de agressões sobre o desenvolvimento.

O período crítico de desenvolvimento é controlado por fatores intrínsecos e extrínsecos, epigenéticos, responsáveis pela ativação de genes de maneira seqüencial em momentos diferentes. Esses processos incluem vários fatores ambientais e não celulares que podem modificar, modular ou direcionar o desenvolvimento subsequente (Nishi, 1994).

De acordo com a hierarquia proposta por Sherrington, os padrões motores poderiam ser ordenados em respostas reflexas, que são comportamentos mais simples e menos sujeitos ao controle voluntário; em padrões motores rítmicos, como os padrões de marcha, que combinam elementos de ações reflexas e voluntárias; e finalmente, em movimentos voluntários, que são mais complexos, geralmente dirigidos a uma função ou propósito, sendo obtidos através de aprendizado (Miles e Evarts, 1979; Rosembaum, 1990).

No ser humano, uma série de fatores ambientais e sociais interfere na evolução da postura de bipedestação. Embora exista um padrão geneticamente pré-estabelecido para a construção desta postura (Bril, 1997), este padrão é construído desde o nascimento, com a experimentação de sensações de movimento. As primeiras sensações do neonato são providas pelos reflexos primitivos, os quais se dissociarão

posteriormente em reações mais elaboradas que persistirão durante toda a vida, oferecendo ao indivíduo um repertório de ações que se adequa às diversas situações (Bly, 1996; Bril, 1997; Massion, 1998; Schmid et al, 2005). Os dois primeiros anos de vida são fundamentais no aprendizado motor da criança, onde ela passa de um estado de total dependência e incapacidade de ação contra a gravidade, para um estado de relativa independência motora, sendo capaz de locomover-se sozinha e desempenhar diversas habilidades funcionais. Nesta evolução, mecanismos de controle postural de ajuste estático e dinâmico durante a locomoção e o desempenho de habilidades são desenvolvidos na dependência da complexa integração entre níveis motores, sensoriais e de representação cortical, mais uma vez demonstrando o papel da integridade estrutural sobre o aprendizado motor (Massion, 1998).

Do ponto de vista de desenvolvimento estrutural no rato, a maior parte das projeções descendentes do cérebro alcançam a medula espinhal alguns dias antes do nascimento, entre elas as vias retículo e vestibuloespinhais, assim como as projeções serotoninérgicas e noradrenérgicas, estreitamente implicadas com a iniciação e modulação de padrões motores (Clarac et al, 2004; Lidov e Molliver, 1982). Entretanto, embora possam ativar padrões motores rítmicos semelhantes ao movimento de nadar ou rastejar, são apenas parcialmente funcionais, e seu desenvolvimento será completado por volta do final da segunda semana pós-natal. Assim, uma locomoção mais complexa, como a marcha ou o correr, será desenvolvida a partir desta época pós-natal, seguindo a maturação do sistema vestibular, das vias descendentes e da regulação dos reflexos posturais (Brocard et al, 1999; Clarac et al 2004).

Todas estas 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).

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 e 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, ou seja, aos 21 dias de vida, 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).

Os reflexos primitivos no rato, da mesma forma que no ser humano, favorecem suas primeiras movimentações no meio externo, com função de estimulação sensorial e proprioceptiva, atuando como uma primeira etapa na organização sensório motora. Se analisados individualmente, pode-se perceber o quanto estão relacionados com a construção de comportamentos motores mais elaborados, relacionados à postura e movimentos. Segundo Fox (1965), os seguintes reflexos podem ser testados no início da vida, em ratos: Preensão Palmar, Endireitamento ou Recuperação do Decúbito, Colocação Pelas Vibrissas, Aversão ao Precipício, Geotaxia Negativa e Endireitamento em Queda Livre.

As atividades locomotoras durante os primeiros dias de vida no rato são caracterizadas por uma interrelação entre a manifestação de padrões rítmicos de movimentação e a influência do sistema vestibular, frente às necessidades impostas pela atuação da gravidade (Clarac et al, 1998). O gradiente de maturação da locomoção evolui no sentido rostro-caudal, com um controle inicial da cabeça e de patas anteriores adquirido na primeira semana pós-natal, seguido por uma aceleração mais rápida na maturação funcional das patas posteriores (Clarac et al, 1998; Vinay et al, 2005).

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, a buscar o mamilo materno para se alimentar, e se manter em contato com a ninhada buscando equilíbrio térmico (Jamon e Clarac et al, 1998, Lopes de Souza et al, 2003). 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, 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.

1.1.2 Sistema Muscular: desenvolvimento precoce, organização estrutural e funcional

Desenvolvimento e Organização Geral

No ser humano, os músculos representam 43% do peso corporal no adulto. A organização estrutural do músculo esquelético se reflete nas suas propriedades funcionais, que variam segundo o tipo de fibras predominantes.

O desenvolvimento do tecido muscular se inicia bastante cedo na embriogênese. Células miogênicas são originadas a partir do epiblasto de forma bastante precoce, antes mesmo da formação dos somitos, quando é possível identificar a expressão das proteínas myf-5 e MyoD, que têm funções de regulação sobre o músculo (Kablar et al, 2003) e apresentam sua maior expressão justamente nas fases iniciais da vida (Tamaki et al 2002). Ressalte-se que as células miogênicas migram muito precocemente dos somitos para os brotos dos membros, durante o processo de desenvolvimento (Kablar et al, 1999). Após ocorrerem as condensações dos elementos esqueléticos dos membros, as células miogênicas começam a coalescer, formando duas massas musculares comuns, sendo uma para os músculos flexores e outra para os extensores. A fusão dos mioblastos, diferenciando-se em miotubos primários, começa a ocorrer durante estes estádios iniciais do desenvolvimento dos músculos (Goss, 1978). Posteriormente, as massas musculares comuns se dividirão em precursores dos músculos definitivos.

O crescimento dos músculos, que já assumiram sua forma definitiva no embrião, é realizado pela divisão de suas células-satélites e pela fusão de sua progênie com as fibras musculares. É um processo intenso, necessário para acompanhar o crescimento do sistema esquelético, no embrião. Os núcleos das células satélites que vão sendo adicionados aumentam o potencial da fibra muscular em produzir proteínas estruturais e

contráteis, que aumentam a área de secção transversa de cada fibra muscular (Tamaki et al, 2002). Em termos de organização estrutural, num músculo intacto adulto, uma grande quantidade de miobibrilas (cerca de 2.000) se associam para formar uma fibra muscular, que se mostra como uma célula multinucleada, alongada e cilíndrica, delimitada por uma membrana denominada sarcolema, e contendo o sarcoplasma. Cada fibra se encontra recoberta por uma fina camada de tecido conjuntivo chama endomísio. A organização lado a lado de diversas fibras e seus endomísios formam um conjunto denominado feixe. Por sua vez, cada feixe é delimitado por uma camada mais espessa de tecido conjuntivo, denominada perimísio. O conjunto de feixes agrupado pelo revestimento epimísio representa a forma macroscópica do músculo esquelético. A trama de tecido conjuntivo se une a cada extremidade do músculo, formando o tecido conjuntivo denso dos tendões. Estes se unem à camada externa dos ossos, o perióstee, e constituem a ligação mecânica entre músculo e osso (Schmalbruch, 1985).

Em seres humanos, a maior parte dos eventos que definem as propriedades funcionais do músculo esquelético ocorrem até o final do período pré-natal (Schmalbruch, 1985). Em ratos, entretanto, tais eventos se prolongam até o final do período neonatal, ou seja, as três primeiras semanas pós-natais, que correspondem ao período de aleitamento (Ho et al, 1983; Punkt et al, 1998). No momento do desmame, aos 21 dias de idade, quase todos os elementos funcionais estão preparados para permitir uma locomoção independente no momento em que os filhotes deixam o ninho. Durante estas três primeiras semanas de vida, ocorrem numerosas e complexas mudanças nas propriedades histoquímicas, bioquímicas e metabólicas (Punkt et al, 2004).

O período de rápido crescimento pós-natal em ratos apresenta três fases (Ellender et al, 1988). A primeira compreende um período de desenvolvimento, durante

as três semanas iniciais de vida pós-natal. É seguida por uma segunda fase de rápido crescimento, que atinge um determinado platô por volta das 10 semanas de idade, e coincide com o período de maturação sexual (Ellender et al, 1988; Punkt et al , 2004). Uma terceira fase de maturação acompanha a idade adulta, com uma lentificação no ganho de massa corporal e maturação esquelética. Um aumento progressivo na massa de músculos esqueléticos é o fator que contribui primordialmente com a evolução da curva de massa corporal (Goss et al, 1978; Tamaki e Uchyama, 1995).

O crescimento longitudinal do músculo se dá por adição de sarcômeros, geralmente nas extremidades das fibras musculares, sendo o aumento no diâmetro muscular uma consequência da adição de novas miofibrilas (Goss, 1978). Considera-se que a formação de novas fibras musculares encerra-se antes ou logo após o nascimento (Ontell e Dunn, 1978; Ontell e Kozeka, 1984). Entretanto, a possibilidade de aumento no número de fibras musculares após o período pós-natal imediato (Tamaki e Uchiama, 1995), assim como a ocorrência de hiperplasia e regeneração em músculos adultos (Tamaki et al, 1992), levou ao questionamento sobre mecanismos de formação de novas células. É aceito atualmente que existem células precursoras que se distinguem das células satélites nos espaços intersticiais, durante a fase de rápido crescimento pós-natal, as quais contribuem para a formação de novas fibras durante o crescimento muscular e que, embora tenham expressão reduzida com o avançar da idade, continuam a contribuir para a hiperplasia quando o músculo é submetido a processos de treinamento ou aumento de atividade (Tamaki et al, 2002).

Por outro lado, do ponto de vista da contratilidade muscular, é possível observar desde o início do período fetal um amadurecimento gradual das propriedades fisiológicas, que acontece até pouco após o nascimento (Tamaki et al, 2002).

O padrão de contratilidade muscular precoce no rato, que reflete a construção de padrões iniciais de locomoção, representa de modo interessante a atuação muscular nesse processo, por reunir os achados mais frequentes relacionados ao desenvolvimento em mamíferos (Gramsbergen, 1998). No 16º dia de vida embrionária, é possível observar as primeiras movimentações de tronco e membros, e movimentos com certa coordenação entre os apêndices (patas) podem ser vistos no 20º dia embrionário. Se o rato for colocado na água no 1º dia de vida pós-natal, observam-se movimentos rítmicos com as patas, semelhantes aos de natação (Gramsbergen, 1998, Clarac, 1998). 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, devido a um maior controle postural e coordenação entre grupos musculares, conforme demonstrado por eletromiografia (EMG), o rato consegue sustentar-se sobre as quatro patas, podendo realizar alguns passos (Gramsbergen, 1998, Clarac, 1998). Ao final da segunda semana, no 15-16º dia, verifica-se um melhor padrão de marcha, com maior abdução de patas posteriores oferecendo melhor base de sustentação e maior velocidade de deslocamento. Através da EMG, identifica-se a expressão de um padrão recíproco de ativação de grupos musculares flexores e extensores nas patas (Gramsbergen, 1998).

O estudo com 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 (Gramsbergen, 1998). 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).

Entretanto, além desta fase precoce do desenvolvimento e durante toda a vida, a estrutura muscular sofre influência da atividade que lhe é imposta, a exemplo de exercício físico ou na hipoatividade, com consequências sobre seu trofismo, tipologia de fibras e em suas funções contráteis e elásticas (Canon e Goubel, 1995; Baldwin e Haddad, 2001; Lambertz et al, 2001).

Tipologia e Diferenciação de fibras musculares

Os músculos de mamíferos raramente são homogêneos, e sim compostos por proporções variáveis de diferentes tipos de fibras. A maioria dos músculos esqueléticos em mamíferos contém os três tipos de fibras, ou seja, tipo I, IIa e IIb, em proporções variáveis (Ho et al, 1983; Punkt et al 1993). Pode-se assim definir como lentos os músculos ricos em fibras do tipo I, como o solear (que no rato apresenta 80% de fibras tipo I). Um exemplo de músculo rápido é o extensor longo dos dedos (*extensor digitorum longus*-EDL, com 90% de fibras tipo II em ratos (Ho et al, 1983; Punkt et al 1993).

A diferenciação de fibras musculares é um exemplo interessante da complexidade do período inicial de crescimento e desenvolvimento. O músculo esquelético demonstra uma diferenciação gradual de fibras lentas para rápidas, assim como uma diferenciação de fibras rápidas nos tipos IIa e IIb (Umezu et al, 1992; Smith et al, 1998). A heterogeneidade funcional muscular é reforçada pela proposição de outras formas de fibras, qualificadas como intermediárias (Bacou e Vigneron, 1988;

Pette e Staron, 2000; Bottinelli et al, 1994; d'Albis et al 1994). A presença destas fibras intermediárias, as quais podem sofrer modificações na sua expressão de acordo com as demandas funcionais que lhe forem impostas, caracterizam de maneira muito importante o aspecto da plasticidade muscular, principalmente nas fases iniciais da vida (Agbulut et al, 2003).

O fato de que uma fibra muscular pode possuir um caráter híbrido, com uma co-expressão de mais de uma isoforma de miosina e com diferentes combinações dessas isoformas (Bottinelli et al, 1994) pode favorecer o mecanismo de transição do tipo de miosina dentro de um músculo, quando o mesmo é submetido a mudanças na demanda funcional, por exemplo por hipo ou hiperatividade (Baldwin e Haddad, 2001). Tais transições, que podem por exemplo levar gradativamente uma isoforma de cadeia pesada de miosina (MHC, *myosin heavy chain*) MHC I ao extremo MHC IIb, e vice versa (Pette, 2002), assim, caracterizam o alto poder adaptativo das fibras, o que permite a um músculo modificar seu fenótipo para se adaptar a uma nova demanda funcional.

Através de um estudo sobre a evolução do conteúdo de MHC em diversos músculos esqueléticos no camundongo, pode-se observar que é exatamente na fase pós-natal imediata, onde os músculos estão se adaptando para as novas habilidades funcionais devido à influência da gravidade e da experiência dos primeiros movimentos, que o perfil miotipológico se estabelece (Agbulut et al, 2003). Camundongos recém-nascidos apresentam como formas predominantes de miosina os tipos embrionário e neonatal, com pequena expressão de isoformas do tipo I em músculos das patas posteriores. Estas são substituídas por isoformas adultas nos primeiros dias após o nascimento, seguindo uma cronologia de maturação e um estabelecimento de padrões fenotípicos adultos diferentes em músculos funcionalmente distintos. Para o EDL,

isoformas neonatais são completamente eliminadas aos sete dias pós-natais, mas no solear são encontradas ainda aos 14 dias pós-natais (Agbulut et al, 2003).

As isoformas do tipo I aumentam progressivamente no solear, mas no EDL apresentam um aumento rápido nos primeiros dias pós-natais e diminuem posteriormente, representando menos de 4% do total no músculo maduro. O contrário é observado na expressão das isoformas rápidas: o tipo IIb, por exemplo, é encontrado no EDL já no 5º dia pós-natal, sendo a principal isoforma expressa neste músculo na idade adulta, onde mais de 90% das isoformas expressas são do tipo rápido. No solear, embora a forma IIb não seja encontrada no adulto, ela se expressa transitoriamente entre 14 e 28 dias pós-natais. Ressalte-se que neste músculo a isoforma rápida IIa pode ser encontrada a partir da primeira semana pós-natal (Agbulut et al, 2003).

Estudos de outros autores também demonstram um aumento relativo de fibras de contração lenta no músculo Solear, em detrimento da proporção de fibras de contração rápida após a idade de desmame (Ishihara e Taguchi, 1991; Konishi et al, 2000; Punkt et al 2004). Por outro lado, para o músculo EDL, de contração rápida, a literatura mostra uma grande variabilidade no grau de modificações de propriedades histoquímicas induzidas pelo crescimento (Smith et al, 1988; Sugiura et al, 1992; Yamaguchi, 1993; Punkt et al, 2004). Já foi relatado que o percentual de fibras lentas, ou seja, do tipo MHC I, mostrava-se sem modificações, ou ainda com redução na sua proporção devido ao processo de maturação (Smith et al, 1988; Sugiura et al, 1992; Konishi et al, 2000).

Obviamente, a atividade neuromuscular desempenha um papel fundamental no estabelecimento de um padrão fenotípico de fibras musculares durante o desenvolvimento, assim como na manutenção de suas propriedades fenotípicas (Rubinstein e Kelly, 1978; Pette e Vrbova, 1985). Junções neuromusculares se formam no período embrionário, com maturação que se continua até as primeiras semanas pós-

natais. A diminuição da poli-inervação, assim como o aumento na complexibilidade e tamanho das junções, que são sinais de que tanto o músculo quanto as junções neuromusculares atingiram um padrão fenotípico adulto, são características que se desenvolvem durante as primeiras semanas pós-natais (Jansen e Flaby, 1990).

Assim, na idade do desmame em ratos, os músculos esqueléticos apresentam um padrão miotipológico bem definido, segundo seu perfil funcional. É interessante ressaltar que é nesta idade que os filhotes deixam o ninho, estando prontos para exercer suas funções motoras na locomoção e desempenho de habilidades comportamentais diversas (Punkt et al, 2004).

Mesmo em animais adultos, condições experimentais que impunham alterações à livre movimentação e ao suporte de peso em patas posteriores, como o modelo de suspensão, foram capazes de induzir a modificações no perfil miotipológico, principalmente no músculo solear, um músculo essencialmente postural (Riley et al, 1990). Em ratos jovens, os efeitos da hipoatividade durante o período neonatal também foram observados no processo de diferenciação de fibras, de forma mais marcante no solear, o qual apresentou atraso na transição de fibras rápidas em lentas (Huckstorf et al, 2000). Mesmo no músculo rápido EDL, sinais de atraso na maturação devido à ausência de carga puderam ser demonstrados, devido à persistência de formas de miosina embrionária (Huckstorf et al, 2000). Concomitantemente, foi também demonstrado um retardo na maturação de placas motoras em decorrência da hipoatividade, o que ocorreu de forma seletiva de acordo com o tipo de músculo: apenas o solear apresentou estas alterações (Huckstorf et al, 2000).

A atividade motora, então, será ao mesmo tempo determinante para o estabelecimento da continuidade de processos de maturação muscular, e influenciada pelo seu uso. Em termos de propriedades mecânicas musculares, portanto, pode-se

esperar igualmente alguma repercussão da atividade motora ou outras influências exógenas agindo sobre o seu desenvolvimento.

Propriedades Biomecânicas no Músculo Esquelético

Músculos classificados como rápidos ou lentos diferem entre si não apenas pela proporção de diferentes fibras, mas também por apresentarem diferentes características relacionadas às suas propriedades contráteis e elásticas (Close, 1972).

Para uma melhor compreensão sobre a contribuição das diferentes estruturas que compõem o músculo no desempenho de suas funções, foi necessário estabelecer um modelo teórico, capaz de simplificar o *modus operandi* do sistema real, mantendo porém uma idéia o mais fiel possível de seu funcionamento. Dessa forma, um modelo foi proposto por Hill (1938), a partir da análise de outros modelos elaborados anteriormente pelo mesmo autor (1922) e aperfeiçoado posteriormente. Assim, foi proposto um chamado modelo a três componentes, caracterizados como Componente Contrátil (CC), Componente Elástico em Série (CES) e Componente Elástico em Paralelo (CEP), numa representação macroscópica a nível do complexo músculo-tendão. Uma contribuição do modelo molecular baseada nos estudos de Huxley e Simmons (1971) permitiu progressivamente a identificação de duas frações separadas, ao nível do componente elástico em série. Assim, o modelo a três componentes atualmente utilizado traduz uma representação esquemática (Fig 1, Shorten, 1987) e definindo anatomicamente cada componente funcional.

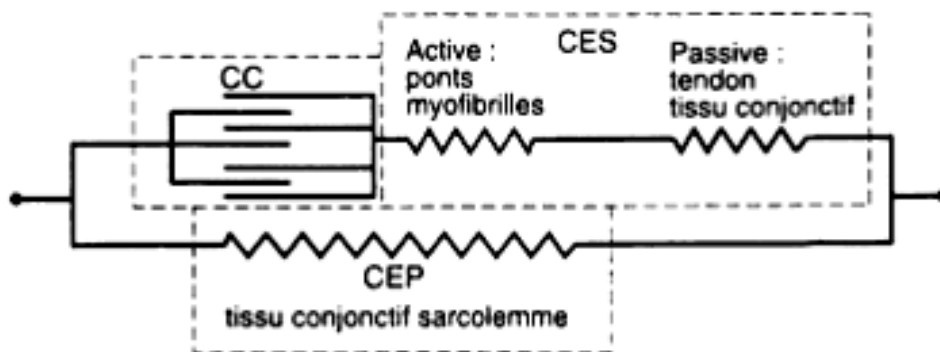


Figura 1: Modelo muscular a três componentes (segundo Shorten, 1987)

As características particulares de cada componente deste modelo, com os métodos definidos de avaliação, serão descritos a seguir.

Componente Contrátil (CC)

Corforme definido segundo o modelo de Hill, é o componente gerador de força. Neste nível, a energia química é transformada em energia mecânica. Diversos parâmetros são utilizados para a análise do CC.

A força contrátil desenvolvida neste componente durante a contração muscular – com encurtamento do seu tamanho original - ocorre em função da variação deste comprimento e da velocidade em que isto ocorre. Assim, essas duas variáveis possibilitam a construção de duas relações, que caracterizam o CC: a relação força-comprimento em condições isométricas (contração muscular em comprimento constante) e a relação força-velocidade, em condições isotônicas (com força constante) ou isocinéticas (com velocidade de encurtamento constante). Na relação força-comprimento, busca-se mensurar a força desenvolvida em diferentes comprimentos do músculo, o que permite traçar uma curva de crescimento desta força até o momento onde ela se mostra mais alta, e a partir do qual começa a decair. Através desta

estratégia, é determinado o comprimento ótimo para o desenvolvimento de força, denominado L_0 (Goubel e Lenseil-Corbeil, 2003).

A Relação Força / Velocidade, descrita por Hill e Lupton em 1922, demonstra uma relação entre a força desenvolvida pelo músculo e a velocidade de encurtamento do mesmo, em condições isocinéticas. Através desta, observa-se que a força diminui com o aumento da velocidade de encurtamento que lhe é imposta. Em outras palavras, no momento em que um músculo é tetanizado ao máximo e desenvolve uma força P_0 em condições isométricas, se lhe é imposta uma redução no seu comprimento durante a contração (em condições isotônicas), em uma dada velocidade V , ele passa a desenvolver uma força inferior, denominada P . A Velocidade Máxima de Encurtamento do músculo (V_{max}) pode ser avaliada através de experimentação utilizando a técnica do músculo isolado e estimulado em contração tetânica, que é submetido a encurtamentos a diferentes velocidades, sob carga constante.

A força constante apresentada durante o estado de ativação sofre variações de acordo com a velocidade do encurtamento, sendo mensurada e ajustada matematicamente numa curva tipo hiperbólica, através da Equação de Hill (Figura 2). Aplicando velocidades variadas e determinando os valores P e V obtidos em diversos pontos, pode-se obter a V_{max} sob carga nula. A linearização da curva pode ser obtida igualmente, para determinação da V_{max} (Figura 3).

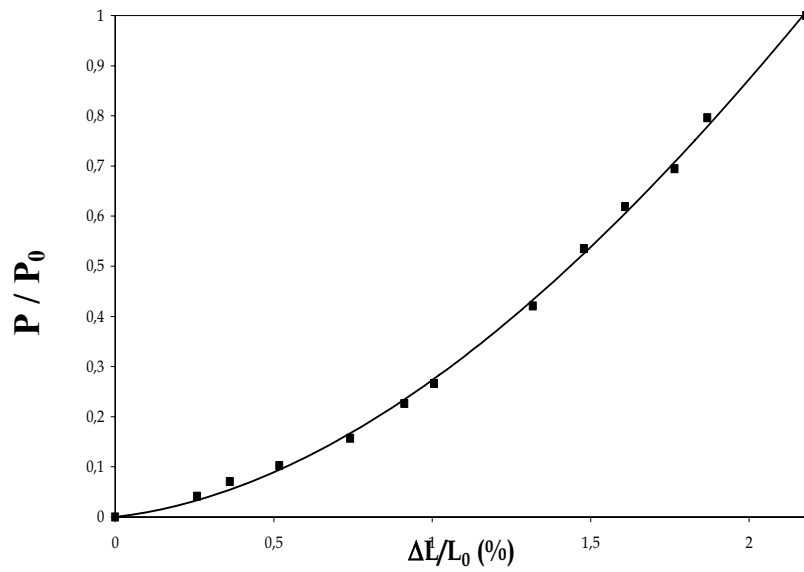


Figura 2: Curva hiperbólica típica na Relação Tensão- Extensão

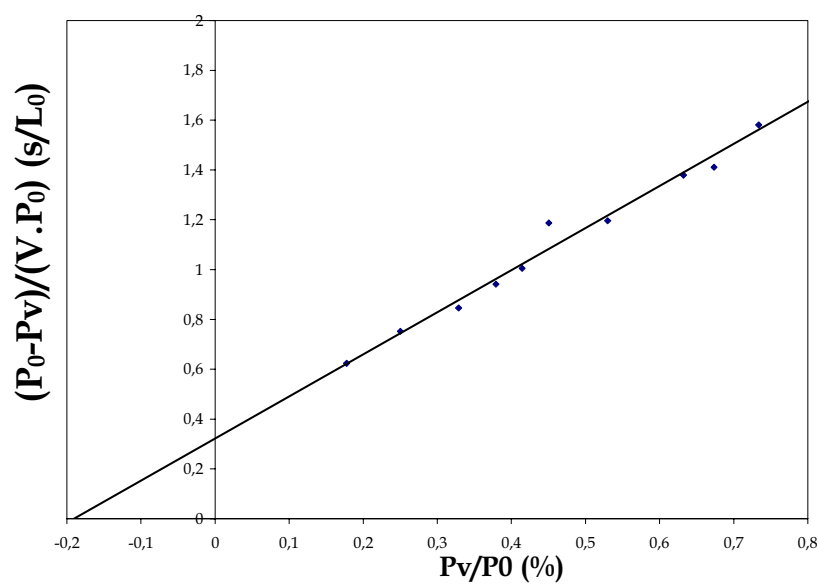


Figura 3 : Relação Típica Força-Velocidade, linearizada. Ponto de intersecção = Velocidade Máxima de Encurtamento (V_{max})

Músculos lentos e rápidos apresentam diferentes características quanto à V_{max} . Um músculo rápido como o EDL em ratos apresenta V_{max} muito mais elevada que um músculo lento, como o solear (Ranatunga, 1982; Eken and Gundersen, 1988; Bottinelli

et al, 1994). O parâmetro a/P_0 , que define concavidade da curva força-velocidade, também difere entre músculos lentos e rápidos, sendo a concavidade formada nesta relação menos pronunciada em músculos rápidos, indicando uma relação a/P_0 mais importante. Esta afirmação também é verdadeira para estudos em fibras isoladas (Bottinelli et al, 1991). O que tem sido demonstrado quanto a esta variabilidade, é que a V_{max} sofre uma influência da variabilidade de isomiosinas presentes na fibra muscular. A sobreposição dos valores de V_{max} encontrados para diferentes tipos de fibras (Bottinelli et al 1991) sugere a presença de diferentes isoformas numa mesma fibra muscular e, assim, o resultado final seria consequência da proporção das mesmas. Se a proporção de cadeias pesadas de miosina é levada em consideração no desenvolvimento da V_{max} (ou da V_0 , nos trabalhos em fibras isoladas), levando em consideração que as fibras do tipo I com predominância das isoformas mais pesadas SM_1 ou SM_2 apresentam as velocidades mais baixas, a contribuição das cadeias leves (MLC) também deve levada em conta. Foi demonstrado que músculos rápidos mais ricos em MLC tem maior velocidade de encurtamento, sendo esta velocidade na fibra (V_0) maior quanto maior a proporção de MLC, como nas fibras IIB que apresentam grande proporção de MLC 1f e MLC 3f (Bottinelli et al, 1994; Schiaffino e Reggiani, 1994). Sendo que a proporção de tipos de fibras nos músculos se modifica com a idade, é de se esperar que a V_{max} também mostre variações segundo o desenvolvimento (Close, 1964).

Outro fator que pode influenciar a V_{max} é a arquitetura muscular. Um músculo com maior ângulo de penação apresenta velocidades mais baixas em relação a um músculo com arranjo de fibras em paralelo, se levada em consideração a velocidade num sarcômero idêntico nos dois tipos. Entretanto deve-se ressaltar que sendo a força isométrica máxima maior num músculo penado, isto aumenta igualmente a sua possibilidade de se encurtar, o que influencia a sua V_{max} . (Vandewalle, 1992). Além

disto, Zuurbier e Huijing (1992) afirmam que a velocidade de encurtamento é resultante não apenas da soma das velocidades de fibras, mas também da participação das aponeuroses.

Além disto, modificações na V_{max} foram relatadas em condições de desuso ou *overuse* em ratos adultos (Eken and Gundersen, 1988; Almeida et al, 1994; Canon and Goubel, 1995).

Além da V_{max} , outros parâmetros também caracterizam o CC: a *Tensão e a Cinética da Contração*. A Tensão pode inicialmente ser avaliada a partir de um abalo muscular simples (*twitch*), que é normalmente produzido em reação a um único potencial de ação do neurônio motor. Em preparação de músculo isolado, o *twitch* pode ser obtido em resposta a um estímulo elétrico. Os parâmetros que caracterizam o abalo simples são o tempo decorrido até chegar ao pico da contração (CT, *contraction time*), a tensão produzida durante o pico de CT (P_t = força máxima durante o *twitch*), e o tempo necessário para se atingir 50% do relaxamento após o pico de contração (HRT, *half relaxation time*).

É importante ressaltar que estes parâmetros, CT e HRT, estão estreitamente relacionados à cinética de liberação e remoção de íons cálcio das miofibrilas durante a contração muscular, que exercerão uma influência sobre a relação entre o complexo troponina – tropomiosina e a actina, modificando-a e produzindo a contração e posteriormente o estado de relaxamento (McDonald et al, 1994). Além disto, a tipologia de fibras que compõe o músculo vai influenciar a duração de CT e HRT, pela velocidade de contração que desenvolvem e também pelas diferenças que dependem das características do Componente Elástico em série, normalmente mais extensíveis em músculos rápidos (Ranatunga e Thomas, 1990). Músculos ricos em fibras do tipo I apresentam CT mais prolongado que os chamados rápidos. Por exemplo, no solear de

rato, foi descrito um CT de 84,5 ms, contra 21 ms em um extensor longo dos dedos, em preparação de músculo isolado, a 25°C (Stein et al, 1982). A evolução na diferenciação de fibras com o aumento da idade pode justificar algumas alterações de CT e HRT entre animais jovens e adultos, mas modificações nas propriedades bioquímicas e morfológicas do retículo sarcoplasmático agindo sobre o complexo excitação-contração devem sempre ser levados em consideração. Em relação ao CT, relata-se uma diminuição relacionada com o aumento da idade, tanto em músculos rápidos quanto nos lentos (Close, 1972).

Finalmente, na avaliação do CC, existe o *Teste de Fatigabilidade*, com objetivo de analisar a queda na força produzida durante um trabalho muscular prolongado. O protocolo mais utilizado é o de Burke et al (1973), que emprega trens de de pulso de estimulação, repetidos continuamente todos os segundos, durante dois minutos. Determina-se o Índice de Resistência à Fadiga utilizando-se a comparação entre a amplitude dos tétanos produzidos no decorrer do teste com aquela obtida na primeira estimulação. Em músculos com predominância de fibras do tipo I, o Índice de Resistência à Fadiga é superior ao encontrado naqueles onde predominam fibras rápidas.

Componente Elástico Em Série (CES)

Embora os componentes elásticos que formam a CES sejam mostrados fora do CC, uma proporção deles reside dentro deste componente. Trata-se da fração ativa, representada pelas pontes cruzadas de actinmiosina. A parte passiva deste elemento é constituída pelas estruturas tendinosas do músculo.

O CES tem função de ligação entre o componente contrátil e o restante do músculo, a periferia. Durante a ativação muscular, o CC estira os elementos elásticos do CES. Isso promove o armazenamento de uma energia potencial neste elemento elástico (Cavagna, 1970).

A caracterização do CES é realizada mediante diversos métodos. Em comum, estes métodos buscam exprimir as variações de tensão (ΔP) e de comprimento (ΔL) durante uma avaliação, seja em termos de resistência ($R = \Delta P / \Delta L$), seja em termos de extensibilidade ($E = \Delta L / \Delta P$). De forma geral, a extensibilidade diminui com o aumento da tensão (Goubel e Lensel-Corbeil, 2003). Entre os métodos propostos, será descrito aqui o de “*controlled release*”, que será utilizado neste estudo.

Nesta avaliação, o músculo isolado é previamente submetido a um estado de contração isométrica, num comprimento fixo próximo a L_0 . Então, permite-se que ele sofra uma alteração rápida no seu comprimento no sentido de uma liberação/encurtamento. Como na situação de contração isométrica o CC será a fração encurtada, as variações mecânicas que se observam imediatamente após a perturbação de comprimento podem ser atribuídas exclusivamente ao CES, que estava tensionado e relaxa bruscamente. O músculo continua ativado durante a liberação e, neste momento, se observa uma queda brusca na força produzida. Assim, os cálculos serão realizados associando a queda da tensão muscular (ΔP) à diminuição imposta ao comprimento inicial do músculo (ΔL). As relações entre estes coeficientes de elasticidade se apresentam sob forma de curvas tensão-extensão: $P/P_0 = f(\Delta L/L_0)$.

Os parâmetros que as curvas tensão-extensão permitem avaliar são (Goubel e Lensel-Corbeil, 2003):

- A extensibilidade relativizada (exprimindo ΔL em frações de L_0 e ΔP em frações de P_0) ao nível de P_0 e $0,2 P_0$, que é a relação entre $(\Delta L/L_0)(P_0/\Delta P)$.
- A área da curva, que dimensiona a energia potencial elástica armazenada;
- A extensão máxima, que é o ponto de intersecção da curva com o eixo das abcissas $((\Delta L/L_0)_{\max})$.

Estes parâmetros se apresentam diferentes em músculos lentos e rápidos, tendo sido proposto uma correlação entre a composição de fibras no músculo e estas alterações (Bosco et al, 1982). Estudos utilizando métodos de treinamento ou de desuso muscular demonstraram alterações no CES, associadas com transições no tipo de fibra predominante (Pousson et al, 1991; Almeida et al, 1994; Canon and Goubel, 1995).

Componente Elástico em Paralelo (CEP)

Devido à sua localização estrutural (sarcolema, envoltórios de tecido conjuntivo, pontes residuais de actina e miosina e proteínas de conexão, como a titina e nebulina), o CEP desempenha um papel preponderante sobre a resistência que o músculo oferece ao estiramento passivo.

A força desenvolvida pelo músculo em estado passivo é produzida em função da resistência oferecida pelos componentes do CEP, supondo-se que o CC não estará oferecendo nenhuma resistência no músculo inativado. O CEP é, assim, caracterizado pela relação tensão-deformação, ou tensão-extensão passiva. Esta relação pode ser obtida pelo registro da variação da tensão desenvolvida por um músculo inativado, quando submetido a diferentes estiramentos. Ao se determinar o valor de cada estiramento e o valor da força correspondente, pode-se construir uma curva tensão-

extensão para o CEP. Esta curva demonstra que a tensão passiva cresce de forma exponencial, à medida que aumenta o estiramento do músculo, a partir de um valor próximo ao de L_0 , no qual o músculo normalmente não produz tensão passiva, num comportamento que não segue a Lei de Hook. Da mesma forma, a medida do inverso da inclinação da relação tensão-extensão passiva permite exprimir a flexibilidade do CEP (Goubel e Lensel-Corbeil, 2003).

A tensão passiva desenvolvida é resultado não apenas do estiramento que é imposto, mas também da velocidade com que é induzido. Essa velocidade pode ser extremamente baixa, como no chamado Teste de Estiramento em Rampa Mantida. Por outro lado, o estiramento pode ser induzido em alta velocidade, seja uma única vez, mantendo o estiramento por um período determinado para observar a variação da tensão produzida, no chamado Teste de Relaxamento, seja induzindo vários estiramentos em série, como no Teste de Relaxamento Incremental. Qualquer que seja o teste, procura-se avaliar para cada modificação do comprimento muscular, a produção da tensão, na fase dinâmica (F_d , logo após o estiramento) e na fase estática (F_s), onde a tensão tende a decrescer e se estabilizar (Goubel e Lensel-Corbeil, 2003).

A avaliação destes parâmetros permite apreciar a complexidade da resposta visco-elástica do músculo (Mutungi e Ranatunga, 1996). É importante ressaltar que o fato de o comportamento na fibra muscular isolada ser semelhante ao obtido no músculo inteiro (tensão de repouso x comprimento no sarcômero) permitiu admitir que as miofibrilas participavam no processo de produção da tensão passiva (Magid e Law, 1985). A participação da titina na geração da tensão de repouso é outro aspecto importante: seu segmento extensível fornece resistência ao estiramento, e, por possuir dois segmentos que se comportam como molas em série, tem participação tanto na resposta a estiramentos de pequenas quanto de grandes amplitudes (Granzier e Labeit,

2002). A participação da desmina é também relacionada à produção da tensão passiva (Granzier e Labeit, 2002). Para estiramentos de maiores extensões, a resistência oferecida pelas estruturas maiores, retículo sarcoplasmático, sarcolema e tecidos conjuntivos, é solicitada (Granzier et al, 2000). Existe ainda a possibilidade da participação de pontes residuais de actino-miosina na produção da tensão passiva, a qual, embora já fosse proposta por Hill em 1968, ainda é objeto de discussão (Proske e Morgan, 1999; Goubel e Lenseil-Corbeil, 2003).

A variação das características do CEP vai depender do quanto o músculo seja rico em tecidos de sustentação, assim como da distribuição destes tecidos no músculo. Músculos lentos, como o solear, contém mais colágeno que os músculos onde predominam fibras rápidas do tipo II. No solear, então, a tensão passiva começa a se desenvolver mais rapidamente, a partir de pequenas variações de estiramento, o que significa que tem um comportamento menos extensível em relação aos músculos rápidos (Gareis et al, 1992). Segundo Kovanen (1984a), o músculo solear possui uma resistência duas vezes mais elevada que a apresentada pelo reto femoral, um músculo rápido.

1.2 Repercussões de agressões durante o desenvolvimento

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 (Levitsky e Barnes, 1972; Lynch, Smart e Dobbing, 1975; Morgane, 1993). Atuando sobre o período crítico, a deficiência nutricional é capaz de alterar o padrão dos eventos morfogênicos que ocorrem nesta fase, com conseqüências deletérias para o desenvolvimento e aquisição de padrões fisiológicos maduros do organismo (Resnick et al, 1979; Noback e Eisenman, 1981; Gressens et al, 1997).

Devido à sua prevalência em todo o mundo, notadamente em países subdesenvolvidos, a desnutrição protéico-calórica é um exemplo de deficiência nutricional que acarreta prejuízo ao desenvolvimento do SN (Brow e Pollit, 1996; Monteiro, 1996). É bem estabelecido, tanto em animais experimentais quanto em humanos, que a desnutrição provoca alterações estruturais neste sistema, tais como: redução do número (Rosso, Hormazabal e Winick, 1970; Zamenhof, VanMartens e Grael, 1971; Leuba e Rabinowicz, 1979) e da forma (Resnick et al, 1979; Picanço-Diniz et al, 1998) dos neurônios; atraso do processo de mielinização (Noback e Eisenman, 1981) e diminuição do peso cerebral (Leuba e Rabinowicz, 1979; Marín et al, 1995).

Em crianças, a ocorrência de distúrbios na forma de doenças, limitações à livre movimentação ou restrições nutricionais podem afetar negativamente o processo de

desenvolvimento (Barros et al, 2003; Eickman et al, 2003). Atuando sobre o período crítico, a desnutrição pode alterar o padrão dos eventos celulares, com conseqüências deletérias para o desenvolvimento e aquisição de padrões fisiológicos maduros também em outros sistemas orgânicos, conforme demonstrado experimentalmente (Noback e Eisenman, 1981; Segura *et al*, 2001; Paixão *et al*, 2001; Morgane *et al*, 2002). No rato, boa parte dos eventos relacionados ao período crítico de desenvolvimento ocorre nos primeiros 21 dias pós-natais, que correspondem à fase de aleitamento (Morgane *et al*, 1978; Dubovický, Ujházy e Jezová, 1996). Estudos sobre os efeitos da desnutrição precoce em ratos apontaram para atrasos no desenvolvimento de padrões motores e comportamentais (Nagy *et al*, 1977, Guedes *et al*, 2002; Medeiros *et al*, 2001; Barreto-Medeiros *et al*, 2002).

Há várias evidências também em relação a alterações no desenvolvimento de funções motoras em ratos submetidos à desnutrição pré ou pós-natal, demonstrando, por exemplo, retardo na ontogenia de reflexos (Smart e Dobbing, 1975; Barros et al, 2006) e na evolução de padrões locomotores (Lynch, Smart e Dobbing, 1975; Nagy, Porada e Anderson, 1977, Gramsbergen e Westerga, 1992, Barros et al, 2006).

Alterações no desenvolvimento muscular também foram relacionadas à desnutrição, como redução no número de fibras musculares estriadas esqueléticas em ratos durante o período neonatal (Wilson, Ross e Harris, 1988; Ward e Stickland, 1993; Dwyer, Stickland e Fletcher, 1994). Mudanças nutricionais podem alterar o metabolismo protéico nas miofibrilas, ocasionando perda de massa muscular (Fiorotto et al, 2000). De fato, a máxima ativação da síntese protéica e da translação inicial de proteínas miofibrilares no músculo esquelético requer um aporte padrão de nutrientes (Svanberg et al, 1999).

Estruturalmente, são observados na desnutrição atrofia e degeneração das células musculares e modificações estruturais nos sarcômeros (Oumi et al, 2000). Através da análise de aspectos biomecânicos musculares, verificou-se também que a desnutrição pode alterar a performance muscular em ratos adultos, mesmo se imposta por períodos curtos, com efeitos sobre as características de tensão, relaxamento e fadiga muscular (Bissonette et al, 1997).

Para uma possível explicação da associação entre agressões no período crítico do desenvolvimento e repercussões tardias, Hales e Barker (1992) sugeriram o modelo da influência fenotípica, segundo o qual o organismo trabalha para se adaptar favoravelmente a um ambiente hostil durante a fase precoce da vida. Estes autores inicialmente relataram aspectos relacionados à desnutrição fetal e à incidência de diabetes mellitus tipo II na fase adulta (Hales e Barker, 1992). Neste estudo, foi observado que o organismo se adapta à desnutrição perinatal programando o metabolismo da insulina (Hales e Barker, 1992). Esta adaptação tende a aumentar a aptidão do organismo para um provável ambiente agressivo ulterior, embora possa vir a predispor o mesmo a algumas doenças mais tardiamente (Barker e Clark, 1997).

A hipótese da influência fenotípica expande a idéia enunciada pela teoria do período crítico do desenvolvimento. Propõe 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 patologias, as quais tomaram proporções epidemiológicas (Ozanne e Hales, 1998). Embora essa teoria justifique alterações metabólicas referentes a um determinado mecanismo, a expressão de alterações tardias relacionadas, por exemplo, a 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.

As evidências sobre a influência desta hipótese fenotípica sobre outros sistemas, como o nervoso, 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 deste 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 motoras (Otellin *et al*, 2002).

A avaliação da ontogênese motora é uma ferramenta bastante útil no diagnóstico de disfunções relacionadas a alterações do desenvolvimento neuromuscular e psicomotor na infância. Histórias de desnutrição precoce podem estar relacionadas ao atraso no desenvolvimento psíquico e motor em crianças, a exemplo dos relatos de Ivanovic *et al* (1995) e Benefice, Fouere e Malina (1999), que correlacionaram baixos escores escolares a sinais de desnutrição pregressa, e redução na coordenação motora em crianças desnutridas, respectivamente.

Tendo em vista que a desnutrição precoce é capaz de influenciar negativamente o desenvolvimento infantil (Benitez-Bribiesca, 1999; Grantham-McGregor *et al*, 1987; Drewett *et al*, 2001, Laurentino *et al*, 2006), inclusive a evolução de comportamentos motores (Bhatia *et al*, 1979; Benefice *et al*, 1999; Barros *et al*, 2003), diversos métodos foram utilizados para induzir desnutrição em animais experimentais, em sua maioria empregando dietas com proteína de alta qualidade (caseína) em quantidades restritas (Smart e Dobbing, 1971; Morgane 1978). No entanto, a utilização de proteínas

de baixa qualidade, oferecida *ad libitum* tem sido igualmente preconizada (Barreto-Medeiros *et al*, 2002).

A desnutrição infantil enquanto questão de saúde pública apresenta-se em escala decrescente (Monteiro *et al.* 1996), embora ainda importante nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Isto é especialmente verdadeiro nas regiões economicamente menos favorecidas, como Norte e Nordeste (Monteiro *et al.* 1996; Romani e Lira., 2004). Na tentativa de obter um modelo de desnutrição experimental que permitisse uma melhor extrapolação dos resultados dos experimentos em animais para humanos e proporcionasse um maior conhecimento sobre os aspectos da desnutrição na população do Nordeste, Teodósio e colaboradores (1990) desenvolveram um modelo de dieta experimental, ao qual denominaram Dieta Básica Regional (DBR), baseada em inquéritos alimentares realizados na região Nordeste do Brasil. A DBR reproduziu em ratos um padrão de desnutrição semelhante ao observado na população infantil desnutrida da região (Teodósio *et al*, 1990).

A experimentação em animais oferece uma oportunidade ímpar de verificar o impacto de injúrias diversas durante o período crítico do desenvolvimento. Em relação ao desenvolvimento motor e do sistema neuro-músculo-esquelético, isto também é verdadeiro.

Nesse sentido, merece um questionamento a influência que cada sistema orgânico pode sofrer mediante uma agressão como a desnutrição, quando esta ocorre durante o período crítico para o desenvolvimento motor.

II. OBJETIVOS

RESUME EN FRANÇAIS : OBJECTIFS

GENERAL :

Evaluer les répercussions de la dénutrition pendant la période de l'allaitement sur le développement de la locomotion et les propriétés contractiles et élastiques des muscles squelettiques chez le rat.

SPECIFIQUES :

- Evaluer le développement neuro-moteur chez le rat, à travers la détermination des patterns de maturation des réflexes pendant la période neonatale ;*
- Enregistrer et analyser l'activité locomotrice chez le rat pendant la période neonatale ;*
- Etudier les propriétés contractiles et élastiques de deux muscles ayant différentes caractéristiques, le soléaire et l'Extensor Digitorum Longus –EDL, en utilisant la technique du muscle isolé ;*
- Effectuer l'analyse histologique des muscles à l'âge du sevrage et à l'âge adulte.*
- Décrire l'évolution des propriétés biomécaniques et histologiques dans les deux âges.*
- Analyser l'influence de la dénutrition imposée pendant la période d'allaitement sur les paramètres ci-dessus.*

GERAL:

Avaliar as repercussões da desnutrição durante o período do aleitamento sobre o desenvolvimento da ontogênese de reflexos, da locomoção e das propriedades contráteis e elásticas de músculos esqueléticos em ratos.

ESPECÍFICOS:

- Avaliar o desenvolvimento neuro-motor de ratos através da determinação de padrões de maturação de reflexos durante o período neonatal;
- Registrar e analisar a atividade locomotora de ratos no período neonatal;
- Estudar as propriedades contráteis e elásticas de dois músculos com diferentes características, o solear e o extensor longo dos dedos, usando a técnica do músculo isolado.
- Realizar análise histológica para caracterização da diferenciação de tipos de fibras musculares no animal ao desmame e à idade adulta, e de acordo com a manipulação nutricional.
- Descrever a evolução das propriedades biomecânicas e histológicas dos músculos no período do desmame e na idade adulta.
- Analisar a influência da desnutrição induzida no período de aleitamento sobre os parâmetros acima citados.

III. HIPÓTESES

RESUME EN FRANÇAIS : HYPOTHESES

- La maturation due au processus de croissance et de développement chez le rat permet d'établir un pattern quantitatif dans l'évolution de l'activité locomotrice.*
 - Les propriétés contractiles et élastiques des muscles squelettiques sont différentes à l'âge du sevrage, si comparées au jeune adulte.*
 - La dénutrition pendant la période néonatale retarde le développement des réflexes et de l'activité locomotrice.*
 - La dénutrition pendant la période néonatale retarde les processus de croissance et de différenciation des muscles squelettiques.*
 - La dénutrition pendant la période néonatale induit des modifications des propriétés contractiles et élastiques des muscles squelettiques.*
-
- A maturação devida ao processo de crescimento e desenvolvimento no rato permite o estabelecimento de um padrão quantificável na evolução da atividade locomotora.
 - Propriedades contráteis e elásticas em músculos esqueléticos apresentam-se diferentes na idade do desmame, se comparadas ao rato adulto jovem.
 - A desnutrição no período neonatal atrasa o desenvolvimento de reflexos e dos padrões de atividade locomotora.

- A desnutrição no período neonatal retarda processos de crescimento e diferenciação em músculos esqueléticos.
- A desnutrição no período neonatal modifica as propriedades contráteis e elásticas em músculos esqueléticos.

IV. BASES FUNCIONAIS DA ATIVIDADE LOCOMOTORA: ESTUDOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E EVENTUAIS CONSEQUENCIAS DA DESNUTRIÇÃO PRECOCE

RESUME EN FRANCAIS : IV. BASES FONCTIONNELS DE L' ACTIVITE LOCOMOTRICE: ETUDES SUR LE DEVELOPPEMENT ET EVENTUELLES CONSEQUENCES DE LA DENUTRITION PRECOCE

(IV. PREMIER ETUDE)

4.1 ETUDE DE LA MATURATION DES REFLEXES

Cette partie de l'étude à été réalisé à l'Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.1.1 Animaux et groupes expérimentaux

2 groupes de rats mâles Wistar allaités par une mère dénutrie (Groupe D) ou normonutrie (groupe N) pendant la seule période d'allaitement sont formés. La dénutrition des rats étudiés est donc réalisée par l'intermédiaire de la mère. Afin de standardiser les portées, chacune d'elle est limitée à 6 rats.

Le poids des rats est enregistré tous les jours pendant l'allaitement, puis à l'âge de 30 et de 60 jours.

4.1.2 Materiel et Méthodes d'évaluation de la Maturation des Reflexes

Les différents reflexes ont été évalués, selon les procédures illustrés dans les figures 4 à 10 du premier au 21^{ème} jour post-natal et la date de maturation complète de chaque reflexe a été enregistrée. Les réflexes évaluées sont : préhension palmaire (Palm grasp-PP), récupération du décubitus (righting-RD), placement par les vibrissae (vibrissae placing-CV), aversion au précipice (Cliff avoidance-AP), géotaxie négative

(negative geotaxis), réponse au bruit (startle reflex-RS) et réaction de redressement pendant la chute (free-fall righting-QL).

4.1.3 Analyse des Résultats

La réduction du poids corporel a été observée dès le deuxième jour post-natal chez le groupe dénutri, et a persisté pendant toute la période de l'allaitement. A 30 et 60 jours, le poids corporel est encore inférieur aux normonourris (figure 11).

A l'exception des réflexes de Préhension palmaire et récupération du décubitus, tous les autres réflexes ont présenté un retard dans la date de maturation (Tableau 1).

4.1.4 Discussion

Les résultats de cette étude sont en accord avec d'autres études qui rapportent une réduction du poids et de la croissance chez les rats dénutris (Smart et Dobbing, 1971; Johnson et al, 1991) ; cette perte de poids dès le 2^{ème} jour post natal montre que la dénutrition maternelle a des répercussions sur la qualité du lait dès le premier jour comme Quek et Trayhurn (1990) et Sturman et al (1986) l'ont suggéré.

Les retards dans l'âge de maturation des réflexes obtenus dans notre étude sont en accord avec les travaux de Smart et Dobbing (1971).

Le pattern de l'évolution des réflexes peut démontrer une adéquation de la maturation du SNC durant le développement (Fox, 1965). Ainsi, le retard observé lié à la dénutrition néonatale peut être dû à une altération du développement du SNC. Cette altération peut alors entraîner une hypoactivité dans les premiers jours de vie et avoir des conséquences sur le développement des patterns locomoteurs (Barros et al, 2006).

4.1 Estudo da Maturação de Reflexos

4.1.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, num ciclo de luz (6:00 às 18:00 h) e escuridão (18:00 às 6:00 h) constante, no biotério de experimentação do mesmo departamento.

Ratas com idade de 120 dias foram selecionados e, em seguida, colocadas para acasalar (3 fêmeas /1 macho). O diagnóstico do estado de gestação foi feito através da aferição diária do peso corporal. Confirmado o estado de gestação, as ratas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas-maternidade, onde receberam água filtrada e dieta padrão do biotério, normoprotéica, *ad libitum*.

Para constituir os grupos experimentais, todos os neonatos machos foram separados das respectivas mães, um dia após o nascimento, sendo pesados em seguida. Foram escolhidos os machos com peso entre 6,5 e 8,5 g, sendo sacrificados os neonatos abaixo ou acima dos referidos limites de peso e as fêmeas. O restante dos animais foi então aleatoriamente distribuído entre as mães. Foram constituídas ninhadas de 06 neonatos por mãe. Os animais foram amamentados durante os primeiros 21 dias pós-natais (período de aleitamento). Após o desmame, as ratas-mães foram sacrificadas e seus filhotes passaram a receber a dieta padrão do biotério.

Desta forma, segundo a dieta oferecida durante o período de aleitamento para cada ninhada e sua respectiva mãe, constituíram-se os grupos seguintes: Normonutrido

(N, n=16), que recebeu dieta normoprotéica ou Desnutrido (D, n=20), submetido a uma dieta contendo 7,8% de proteína (Teodósio *et al*, 1990).

Durante o período de aleitamento, os animais foram pesados diariamente, antes dos procedimentos de avaliação, em balança digital (Marte AS 1000C[®], classe II, capacidade máxima 1000g, menor divisão 0,01g), para acompanhamento da evolução do desenvolvimento e controle do estado nutricional. Aos 30 e 60 dias de idade, o peso foi também aferido.

4.1.2 Materiais e Métodos de avaliação da Maturação dos Reflexos

Em cada animal dos diferentes grupos foi analisada diariamente, do 1^o ao 21^o dia pós-natais, no horário de 12:00 às 14:00 horas, a maturação dos seguintes reflexos: preensão palmar (**PP**), recuperação de decúbito (**RD**), colocação pelas vibrissas (**CV**), aversão ao precipício (**AP**), geotaxia negativa (**GN**), resposta ao susto (**RS**) e reação de endireitamento em queda livre (**QL**). Para cada um dos reflexos acima mencionados, foi registrado o dia de sua consolidação, ou seja, aparecimento da resposta total. O dia da consolidação do reflexo era considerado o primeiro dia na primeira seqüência de três dias consecutivos de aparecimento completo da resposta reflexa esperada. As avaliações foram procedidas utilizando-se instrumentos elaborados ou existentes no laboratório, conforme descrição abaixo:

- Preensão Palmar (**PP**) – Utilizando-se um bastonete, com aproximadamente 5 cm de comprimento por 1 mm de diâmetro, fazia-se uma leve percussão na palma da pata dianteira esquerda de cada animal. A resposta era considerada negativa (**Neg**), se houvesse a flexão rápida dos dedos após duas tentativas. Este reflexo é primitivo e inato, sendo sua presença indicativa de imaturidade do sistema nervoso, ou seja, com a

maturação ocorre inibição deste reflexo. Registrava-se, portanto, o dia do seu desaparecimento como positivo (**P**) (fig. 4).



Figura 4 – Procedimento para avaliação do reflexo de preensão palmar (PP). A avaliação era realizada desde o 1º dia PN até o amadurecimento do reflexo. Utilizou-se um bastonete metálico (clip), percutindo levemente a palma.

- Recuperação de Decúbito (RD) - O rato era colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana. Durante 10 s, observava-se a eventual resposta parcial ou total de endireitamento corporal, com retorno ao decúbito ventral. Considerou-se as respostas: **Neg.**, quando o animal não conseguia sair da postura em que fora colocado; **P**, quando o animal girava o corpo e assumia o decúbito ventral, apoiado sobre as quatro patas, dentro de um período máximo de 10 segundos (fig. 5).

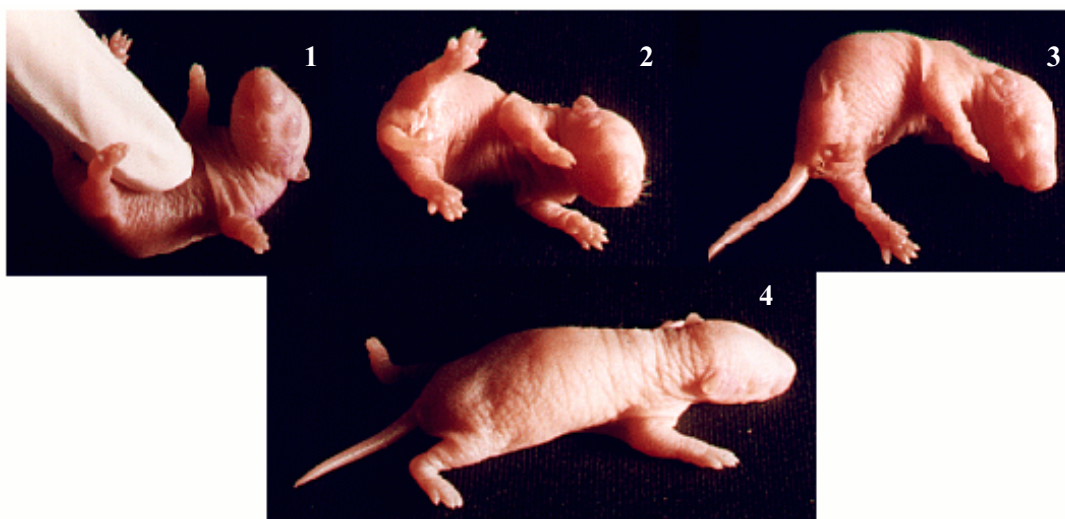


Figura 5 - Procedimento para avaliação do reflexo de Recuperação do Decúbito (RD). Sequência de movimentos : O examinador mantém o rato em decúbito dorsal (1); ao retirar a contenção, o rato gira o tronco, sobre o próprio eixo (2 e 3); o rato alcança o decúbito ventral, apoiado sobre as quatro patas (4).

- Colocação pelas Vibrissas (CV) - O rato era suspenso pela cauda de tal forma que suas vibrissas tocavam levemente a borda de uma mesa, sendo assim mantido. Considerou-se como respostas: **Neg:** A ausência de orientação de movimentos em direção ao apoio;. **P:** o animal, no tempo máximo de 10 s, colocava as duas patas anteriores sobre a mesa e realizava movimentos de marcha, associados com extensão do tronco (fig. 6).

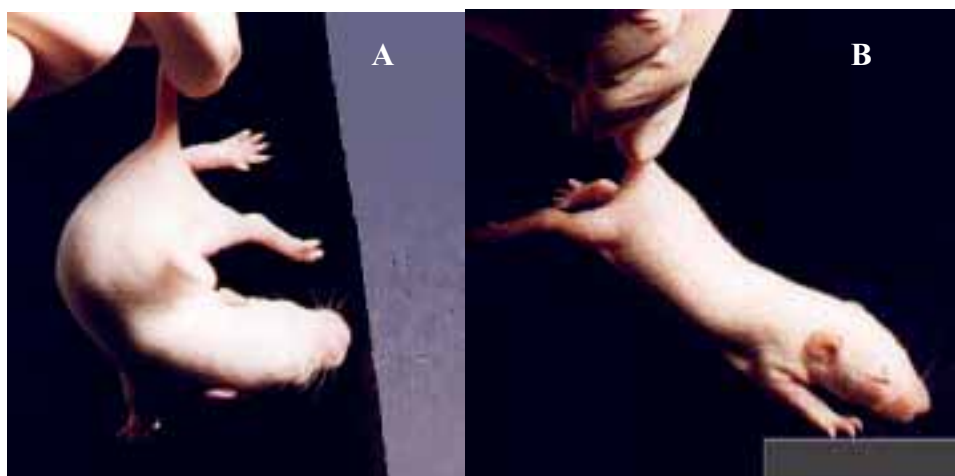


Figura 6 – Procedimento para avaliação do reflexo de Colocação pelas Vibrissas (CV). Sequência: O examinador segura o rato pela cauda, de modo que suas vibrissas toquem a borda da mesa; o rato inclina seu corpo em direção à mesa (A) , apóia as patas anteriores e realiza movimentos de marcha (B).

- Aversão ao Precipício (AP) - O animal era colocado com as patas dianteiras na extremidade de uma superfície plana e alta (mesa) de maneira a detectar o precipício. A resposta era considerada **P** quando o animal, no tempo máximo de 10 s, se deslocava para um dos lados (num ângulo de pelo menos 45 graus) e caminhava em sentido contrário à borda, caracterizando a aversão ao precipício. A resposta **Neg** era caracterizada por ausência de qualquer reação e/ou queda do animal (fig.7).

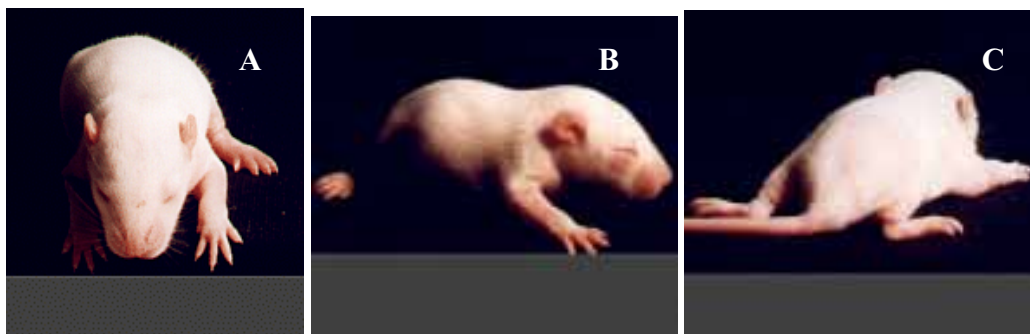


Figura 7 – Procedimento para avaliação do reflexo de Aversão ao Precipício (AP). Seqüência : O rato é colocado próxima à borda da mesa, de forma que suas patas anteriores toquem esta borda (A); ele retrai o corpo, fazendo uma torção lateral do tronco (B) e se afasta da mesa (C).

- Geotaxia Negativa (GN) – O animal era colocado no centro de uma rampa com a cabeça no sentido descendente. A rampa, com 45 graus de inclinação, era constituída de uma superfície (prancheta medindo 34 x 24 cm) revestida com material antiderrapante (papel crepon). Considerava-se como resposta: **P**, o animal, num período máximo de 10 s, girava aproximadamente 140 graus, posicionando a cabeça em sentido ascendente; abaixo deste ângulo, considera-se resposta **Neg** (fig.8).

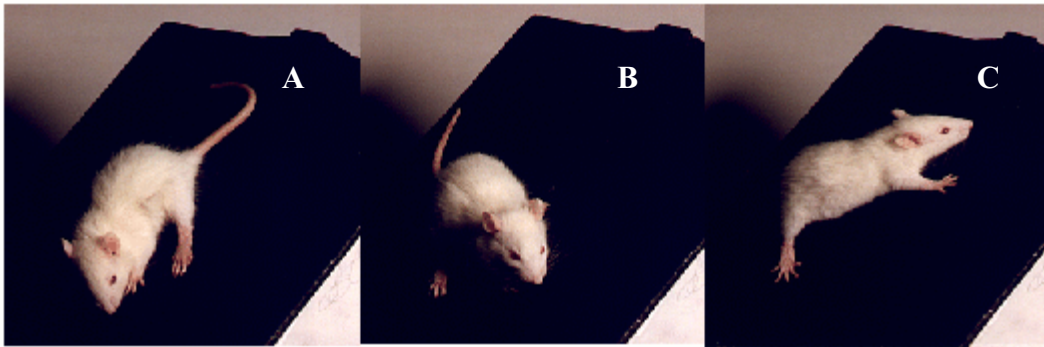


Figura 8 - Procedimento para avaliação do reflexo de Geotaxia Negativa (GN). Seqüência : O rato é colocado sobre uma plano inclinado (45 graus), de forma que sua cabeça esteja voltada para baixo (A); ele faz uma torção lateral do tronco (B), de forma que sua cabeça se dirija para o plano mais elevado (C).

- Resposta ao Susto (RS) - O rato era submetido a um ruído súbito, produzido pela percussão de um bastão metálico sobre um recipiente (4,5 cm de diâmetro x 6 cm de altura) também metálico a uma distância aproximada de 10 cm do animal. A resposta era considerada **P**, quando ocorria uma simultânea retração com imobilização rápida e involuntária do corpo do animal, característica do susto (fig. 9).



Figura 9 - Procedimento para avaliação do reflexo de Resposta ao Susto. Com a batida de um bastão sobre um recipiente metálico, provoca-se um ruído súbito sobre o rato, que se retrai e apresenta tremor.

- Reação de Endireitamento em Queda Livre (QL) - O rato era segurado pelas quatro patas com o dorso voltado para baixo, a uma altura de 30 cm (uma régua de 30 cm, perpendicular ao plano, servia como guia). O animal era então solto e observava-se sua queda livre sobre um leito de espuma sintética (30 x 12 cm). A resposta era considerada **P**, quando o animal realizava uma rotação do corpo, voltando o ventre para baixo e caindo na superfície do leito apoiado sobre as quatro patas (fig.10).

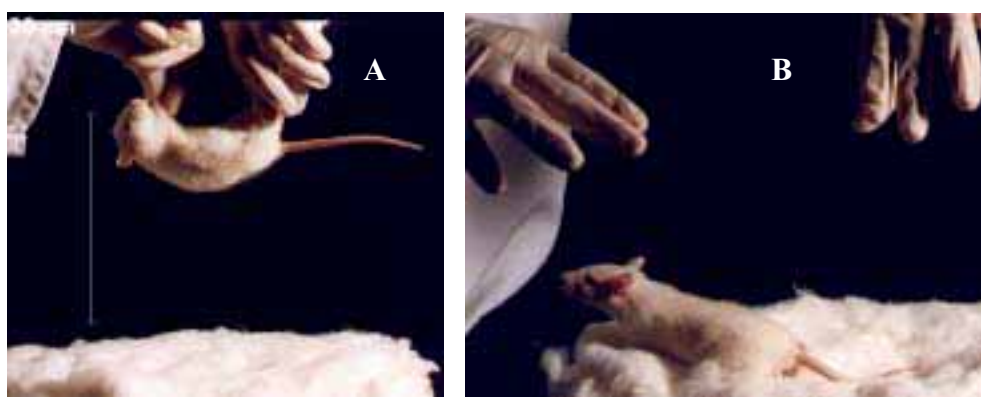


Figura 10 – Procedimento para avaliação da Reação de Endireitamento em Queda livre. O rato é suspenso pelas quatro patas, 30 cm acima de uma superfície macia (A); ao ser solto, gira sobre o próprio eixo durante a queda, apoiando-se nas patas ao atingir o solo (B).

4.1.3 Análise dos Resultados

Os dados foram analisados estatisticamente através do software StatGraphics[®]. Primeiramente, procurou-se identificar a normalidade da distribuição dos dados, através do teste de Kolmogorov-Smirnov, assim como a homogeneidade da variância, através do teste de Levine. Para avaliação da evolução ponderal, o peso em cada idade foi comparado entre as médias obtidas nos grupos Normal e Desnutrido através do teste “t” de Student bi-caudal. Na análise da maturação dos reflexos, a idade de maturação de

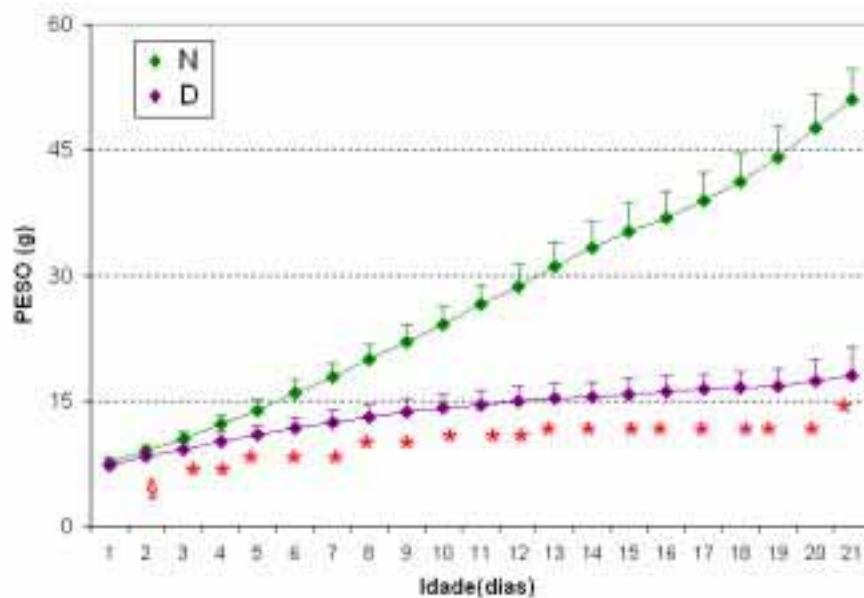
cada reflexo foi expressa em mediana, sendo comparados os resultados entre o grupo Normal e Desnutrido através do teste “U” de Mann-Whitney. A hipótese nula foi rejeitada quando $p \leq 0,05$.

O peso corporal no grupo D apresentou-se reduzido, em comparação ao grupo controle, já a partir do segundo dia de vida ($p < 0,05$), mantendo-se diminuído durante todo o período de aleitamento, até o 21º dia pós-natal ($p < 0,01$) (figura 11). Também foi observada uma redução no peso nos Desnutridos, comparados ao grupo Normonutrido, mesmo após a recuperação nutricional, ao 30º ($p < 0,01$) e 60º ($p < 0,01$) dias de idade.

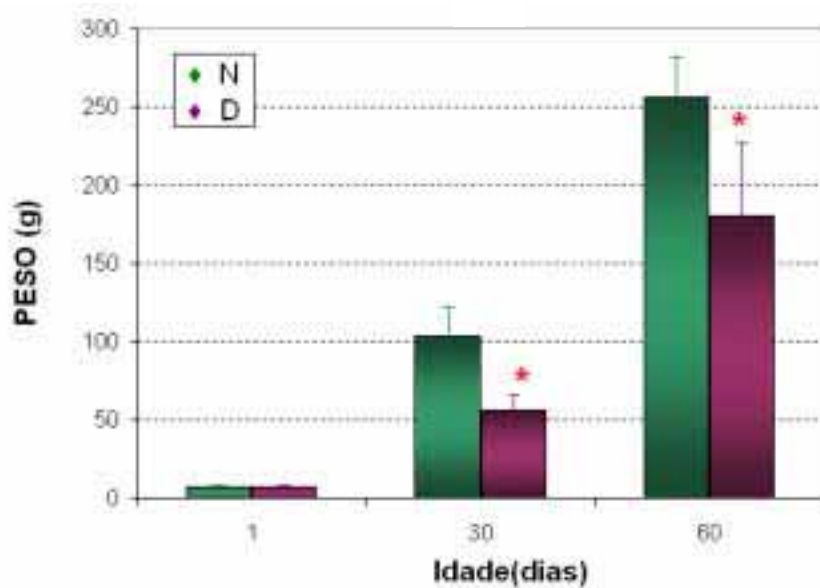
Quanto à maturação dos reflexos, comparado ao grupo N, o grupo D apresentou retardo na data de maturação de: colocação pelas vibrissas (N: 12, 9-14; D: 15, 10-16. $p < 0,01$); aversão ao precipício (N: 13, 12-15; D: 15, 10-19. $p < 0,01$); geotaxia negativa (N: 14, 12-16; D: 16, 10-19. $p < 0,05$); resposta ao susto – RS (N: 12, 11-13; D: 13, 10-16. $p < 0,01$) e reação de aceleração - RA (N: 14, 11-17; D: 16, 15-20. $p < 0,01$) (Tabela 1).

GRUPOS	REFLEXO						
	Preensão Palmar	Recuperação do decúbito	Colocação pelas vibrissas	Aversão ao precipício	Geotaxia negativa	Resposta ao susto	Reação de aceleração
Normonutrido	6 (5-8)	6 (3-8)	12 (9-14)	13 (12-15)	14 (12-16)	12 (11-13)	14 (11-17)
Desnutrido	5 (3-8)	5 (3-9)	15 (10-16)*	15 (10-19)*	16 (10-19)*	13 (10-16)*	16 (15-20)*

Tabela 1: Efeitos da desnutrição sobre a maturação dos reflexos: a ontogênese dos reflexos foi avaliada diariamente, do 1º ao 21º dias pós-natais, sendo os resultados comparados entre os grupos N e D. Valores expressos em mediana (valor máximo e mínimo entre parênteses), representando a idade da maturação do reflexo. Análise estatística: teste “U” de Mann-Whitney. * = $p < 0.05$.



A



B

Figura 11: Efeitos da desnutrição neonatal sobre o ganho de peso corporal em ratos . O peso foi aferido com balança digital (Marte AS 1000C[®]), diariamente, do 1º ao 21º (A) e nos 30º e 60º (B) dias pós-natais. Os valores estão expressos em média $\pm$ DP. Na comparação entre N e D, foi utilizado o teste " t " de student. $\xi = p < 0,05$. * = $p < 0,01$.

4.1.4 Discussão

Os resultados demonstram que a desnutrição neonatal induziu a redução no peso corporal e atraso na maturação dos reflexos.

São bem conhecidos os efeitos da desnutrição sobre a evolução ponderal e o crescimento somático (Morgane et al, 1978; 1993). O presente trabalho corrobora achados anteriores de menor desenvolvimento ponderal em animais desnutridos durante o período de aleitamento (Smart e Dobbing, 1971; Johnson et al, 1991). Neste trabalho, a redução no ganho de peso foi observada já no segundo dia após a introdução da dieta hipoprotéica. Alguns autores relatam redução no peso induzida pela desnutrição a partir do 4º dia pós-natal (Sobotka, Cook E Brodie, 1974; Johnson *et al*, 1991; Barreto-Medeiros et al, 2002).

É interessante observar que no presente trabalho, o modelo de desnutrição foi induzido num momento de depleção das reservas maternas, comum ao final do período gestacional e agravado pelo elevado gasto energético durante o parto (Quek e Trayhurn, 1990). Desta forma, devido à DBR ser uma dieta hipoprotéica (Teodósio *et al*, 1990), a recuperação nutricional foi realizada de forma deficiente após o parto, possivelmente influenciando desde o primeiro dia a qualidade do leite materno. Esta hipótese encontra apoio no trabalho de Sturman *et al* (1986), que observaram redução nas quantidades relativas das proteínas do leite em ratas lactantes desnutridas. Além disso, a tentativa de analisar bioquimicamente o leite de ratas desnutridas no estudo de Marín *et al* (1995) apresentou como obstáculos a diminuição no tamanho das glândulas mamárias e pequena quantidade de leite coletado, o que sugeria uma redução na quantidade do leite produzido. O período perinatal é visto como um stress fisiológico também para o

neonato, no qual uma série de adaptações térmicas e alimentares estão ocorrendo, com gasto energético considerável (Boxwell, Ayson e Ramenofsky, 1995). Assim, considerando que a taxa de aumento de peso do filhote neste período é bastante elevada, a falta de uma ingestão alimentar com qualidade concorrerá para uma redução importante no ganho de peso corporal.

O padrão de maturação dos reflexos, “*produto de uma estimulação pré-estabelecida e precisa*” (Smart e Dobbing, 1971), podem demonstrar uma adequada maturação do SNC durante o desenvolvimento. Fox (1965) demonstrou um padrão bem definido de maturação dos reflexos em camundongos, fornecendo um importante instrumento de avaliação do desenvolvimento. Utilizando este modelo, Smart e Dobbing (1971) encontraram retardo na maturação de reflexos, causado por desnutrição imposta nos períodos pré e/ou pós-natal. Concordando com seus resultados, no presente estudo foi observado um atraso em todos os reflexos avaliados, em decorrência da desnutrição.

A atividade locomotora, analisada sob o ponto de vista do desenvolvimento, mostra-se como uma habilidade cuja execução requer uma série de pré-requisitos. Em decorrência de um estado de adequada nutrição, o desenvolvimento estrutural do corpo e do SN favorece, em cada espécie, a interação com o ambiente que o cerca. Assim, o padrão de locomoção que se desenvolve no rato, em função de uma seqüência temporal determinada, da influência da postura e gravidade, além da integridade do aparelho locomotor (neuro-músculo-esquelético) (Fox, 1965; Walton *et al*, 1992; Gramsbergen, 1998), pode sofrer alterações mediante a interferência de agressões nutricionais ou farmacológicas. Processos que dependam da experiência de movimentos, a exemplo de processos cognitivos, estarão também na dependência de um arcabouço orgânico-locomotor eficiente.

Se uma etapa inicial, como a de maturação de reflexos, apresenta um retardo no seu desenvolvimento, os processos sequenciais no desenvolvimento da atividade locomotora, como a marcha, certamente sofrem alterações. Desta forma, está criado um círculo vicioso de influências negativas no animal em desenvolvimento. Extrapolando esta idéia para a espécie humana, as conseqüências a longo prazo sobre a evolução física e cognitiva podem ser desastrosas (Brown E Pollit, 1996).

No sentido de mensurar as repercussões da desnutrição sobre o desenvolvimento da atividade locomotora, foi executado o segundo estudo deste trabalho, que será descrito a seguir.

4.2 Estudo do Desenvolvimento Neonatal da Atividade Locomotora

RESUME EN FRANCAIS : (IV. DEUXIEME ETUDE)

4.2 ETUDE DU DEVELOPPEMENT NEONATAL DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE

Cette partie de l'étude a été réalisé à l'Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.2.1 Animaux et groupes expérimentaux

Les groupes expérimentaux sont identiques à ceux de l'étude sur la maturation des réflexes.

L'hébergement des animaux et les procédures d'enregistrement ont été faits dans une animalerie et un laboratoire avec inversion du cycle de lumière (ambiance allumée entre 21h et 09 h) afin de permettre l'évaluation des rats pendant la période où ils sont le plus actif, c'est-à-dire la nuit.

4.2.2 Matériel et Méthodes pour l'Evaluation de l'Activité Locomotrice

Une étude pilote menée sur des rats normaux du 1^{er} au 21^{ème} jour post natal a permis de montrer des changements des patterns locomoteurs aux âges de 8, 14, 17 et 21 jours. Les évaluations de l'activité locomotrice ont donc été faites à ces différents âges.

Un système de monitoring de l'activité locomotrice pour petits animaux a spécialement été élaboré et développé en collaboration avec le Département of Physique et l'équipe de la formation en Génie Biomédicale de l'Universidade Federal de Pernambuco. Il s'agit d'un champ circulaire (Ø1m) de surface noir afin d'optimiser le contraste avec le rat et favoriser

l'isolement de son image prise par une caméra vidéo numérique infrarouge liée à un microordinateur équipé d'une carte d'acquisition d'images (voir schéma figure 12). Le rat est ainsi filmé dans une ambiance nocturne pendant deux minutes. Chaque image, espacée de 0.66s, est traitée numériquement afin d'isoler le rat de son environnement (figure 13) et de reconstituer sa trajectoire.

Les différents paramètres calculés sont la distance totale parcourue, la vitesse et la puissance moyenne, la durée totale d'immobilité ainsi que le nombre de fois où l'animal est resté immobile.

4.2.3 Analyse des Résultats

Les résultats sont illustrés sur les figures 14 à 19.

La dénutrition a eu les mêmes effets sur le poids des animaux que dans l'étude précédente.

Les effets de la dénutrition sur l'activité locomotrice sont :

- *Une diminution non significative de la distance parcourue et de la vitesse moyenne chez les rats de 8 et 14 jours alors que ces deux paramètres sont augmentés chez les rats de 21 jours.*
- *Une diminution du temps d'immobilité chez les rats de 21 jours*
- *Une diminution du nombre de fois où l'animal est resté immobile uniquement à 8 jours*
- *Une puissance moyenne diminuée à 17 et 21 jours.*

Il est à noter que l'évolution de l'activité locomotrice avec l'âge suit un pattern identique chez les rats dénutris par rapport aux rats normonutris. Ainsi, la distance parcourue, la vitesse et la puissance moyenne augmentent avec l'âge alors que le temps total d'immobilité diminue.

4.2.4. Discussion

Du fait de l'augmentation de la vitesse moyenne des rats dénutris à 21 jours, la réduction de la puissance observée chez ces rats est due à un poids corporel inférieur chez ces animaux par rapport aux animaux normonutris.

Le pattern d'évolution de l'activité locomotrice a suivi le même sens dans les deux groupes nutritionnels. Ces résultats montrent que, même si les rats dénutris ont une activité locomotrice différente par rapport aux animaux normonutris, cette évolution d'activité est semblable à celle observée chez les rats normonutris.

Le ralentissement initial et la moindre distance parcourue observée chez les animaux dénutris à 8 et 14 jours peuvent être liés au retard de la maturation des réflexes observé dans l'étude antérieure (Barros et al, 2006).

L'augmentation de la vitesse et de la distance chez les dénutris de 21 jours ainsi que la réduction du temps d'immobilité peuvent être associées à une augmentation de l'activité motrice dans le sens d'une hyperactivité non contrôlée. Ce phénomène a déjà été rapporté dans d'autres études comportementales (Nagy et al, 1977). Par exemple, Sobotka et al (1974) ont rapporté une augmentation des mouvements rotatoires des rats dénutris et Teodósio et al (1979) ont montré une exacerbation des réactions de fuite. De même, Lopes de Souza et al (2003) a décrit une agitation des rats dénutris liée à une diminution du temps de regroupement de la portée. Enfin, Salas et al (1998) ont enregistré sur les rats dénutris une augmentation du temps utilisé en self-grooming, comportement révélant une diminution de l'inactivité. Ces modifications peuvent être le résultat d'altérations du SNC. Dans ce sens, Nagy et al (1977) ont démontré une réduction du poids du cervelet liée à la dénutrition précoce pouvant alors avoir des conséquences sur la coordination des mouvements.

Enfin, les modifications de l'activité locomotrice, dans le sens d'une hypoactivité dans les deux premières semaines de la vie, suivie d'une hyperactivité dans la troisième semaine, peuvent avoir des conséquences sur la fonction musculaire, conséquences additionnelles aux effets directs de la dénutrition sur le muscle.

4.2.1 Obtenção dos animais e Grupos Experimentais

Para favorecer uma expressão comportamental mais condizente com o ciclo natural de vigília do rato, um animal notívago, as fêmeas matrizes e machos reprodutores foram adaptados a um ciclo invertido de luz, num biotério desenvolvido especialmente para este fim, localizado no Departamento de Nutrição / UFPE. O ambiente era mantido nas mesmas condições padrão do biotério de criação, com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, porém com inversão do ciclo claro-escuro (luzes acesas entre 21:00 às 09:00 h).

A transferência das fêmeas para este ambiente ocorreu com antecedência de duas semanas em relação ao acasalamento, para permitir uma adaptação do ciclo cronobiológico e evitar a interferência de fatores estressantes sobre o ciclo estral das ratas. Os procedimentos para o acasalamento foram realizados segundo descrito no item 4.1.1. Após o parto, os procedimentos de avaliação e pesagem dos filhotes eram realizados neste mesmo ambiente, de onde só eram retirados para fazer o registro de AL. Para permitir a visão do pesquisador, utilizou-se uma lâmpada de luz vermelha, de espectro não irritante para os ratos. Para o registro de imagens da AL, os animais eram transferidos para o Laboratório de Biomecânica e Experimentação Biomédica (uma sala contígua ao Biotério de ciclo invertido onde o sistema de monitoramento foi montado). Para isto, utilizou-se uma porta entre as duas salas, para evitar que os animais fossem expostos à iluminação do dia. Neste laboratório, o ciclo invertido foi mantido durante o experimento, mantendo-se acesa apenas uma lâmpada vermelha semelhante à utilizada no biotério de ciclo invertido.

Os grupos experimentais Normonutrido (N) e Desnutrido (D) foram formados a partir do primeiro dia após o nascimento, pelo oferecimento de dieta normoprotéica ou

hipoprotéica às lactantes, sendo as ninhadas reduzidas para seis machos, conforme descrito no item 4.1.1. A dieta normoprotéica foi fabricada no Departamento de Nutrição/UFPE, utilizando como proteína de referência a caseína, e seguindo as normas da AIN (Reeves et al, 1993) A avaliação da atividade locomotora nos filhotes foi realizada durante o período de lactação.

4.2.2 Material e Métodos para Avaliação da Atividade Locomotora

O registro de AL foi sempre realizado no horário entre 12:00 e 14:00 h.

Foram avaliados os filhotes de ratos Wistar durante o período de aleitamento, nas idades de 8, 14, 17 e 21 dias pós-natais. Estas idades foram escolhidas após a realização de um experimento piloto, onde a atividade locomotora espontânea (AL) de filhotes foi registrada em vídeo diariamente, do 1º ao 21º dias pós-natais, em duas ninhadas de tamanho semelhante e não submetidas a qualquer manipulação, ou seja, ingênuos. Para a escolha das idades em que a avaliação seria realizada, os filmes foram avaliados por três membros do grupo de pesquisa, para verificação visual de mudanças no comportamento motor. Além disto, as idades escolhidas coincidem com dados na literatura que demonstram uma modificação no padrão de diferenciação de fibras musculares nos diferentes tipos de músculo esquelético, ou seja, aqueles predominantemente lentos ou rápidos (Ishihara e Taguchi, 1991; Punkt et al, 2004), além de mudanças em padrões de recrutamento muscular em tronco e membros, verificadas através de EMG (Gramsbergen, 1998).

Um sistema de monitoramento do movimento de pequenos animais em campo aberto foi desenvolvido em cooperação com o Departamento de Física, com a

colaboração do Curso de Graduação em Engenharia Biomédica, ambos pertencentes à Universidade Federal de Pernambuco -UFPE.

O sistema consiste em um campo aberto circular ($\varnothing 1\text{m}$), delimitado por paredes de 30 cm de altura, sobre o qual a trajetória do animal é registrada com precisão, durante um intervalo de tempo pré-definido de dois minutos. A partir deste registro, várias grandezas físicas são extraídas e posteriormente processadas para obter informações sobre o comportamento do animal.

A filmagem era iniciada quando o animal estava posicionado no centro do campo aberto, cuja cor foi escolhida de forma a maximizar o contraste entre o animal e o fundo. Assim, foi utilizado um fundo preto. Uma câmera digital (VTR[®] 6638 – CCTV System) foi posicionada na linha vertical que passa pelo centro do campo aberto, fixada ao teto da sala, sendo sua distância do local de fixação até o solo do campo aberto igual a 2,65 m. Devido ao ambiente escuro do ciclo invertido, foi utilizada uma câmera que possui sensor de Infravermelho e um conjunto de LEDs de iluminação. Apresenta resolução de 420 linhas e velocidade entre 1/60 e 1/100 s, e sua sensibilidade permite registrar imagens com iluminação mínima, até 0,1 lux. A câmera possui sincronização interna com placa de vídeo. O filme é assim enviado para um computador equipado com placa de aquisição de vídeo e software dedicado às tarefas de aquisição de imagem, através de uma interface (fig. 12).

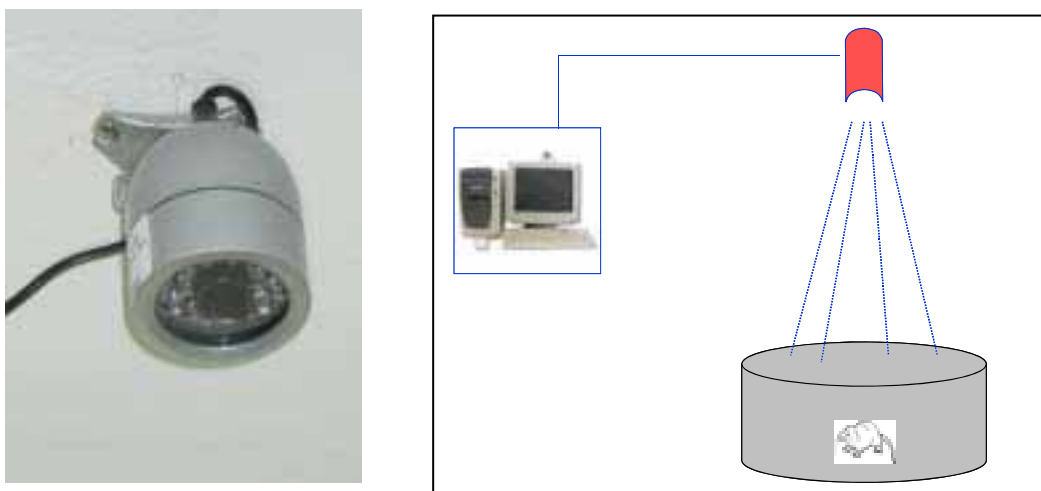


Figura 12: Câmera utilizada para o registro de imagens e representação esquemática do sistema de monitoramento da atividade locomotora em pequenos animais

O vídeo digital do experimento obtido é salvo no *hard disk* do computador através de sua placa de aquisição de vídeo. As imagens do animal no contra o fundo escuro no open-field são isoladas dos objetos ao redor, utilizando-se uma máscara desenhada sobre as mesmas (figura 13).

Realizada essa etapa, inicia-se o processamento e tratamento das imagens. Inicialmente, o vídeo é fragmentado em vários quadros dispostos sequencialmente e separados por um intervalo de tempo memorizado pelo computador. Os quadros são salvos no formato *.TIFF. Para realização da fragmentação, foi utilizada a linguagem de programação *Object Pascal*.

De posse de todos os quadros, utilizando a plataforma MATLAB, foi-se desenvolvida uma série de algoritmos lógicos capazes de analisar as imagens e extrair os parâmetros físicos desejados, sendo esse conjunto de algoritmos denominados de *PROCESS*. Com o algoritmo desejado, calculamos no vídeo estudado a escala de conversão *pixel* para metros e usamos esse valor para a exposição dos dados em unidades convencionais da Física.

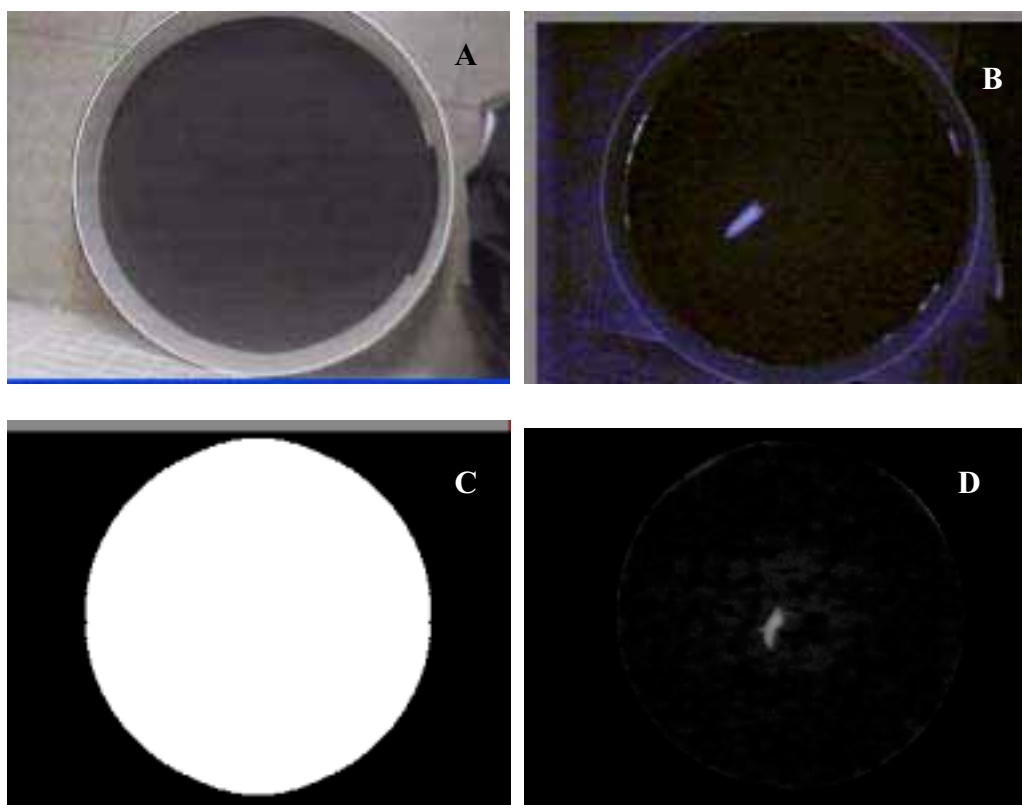


Figura 13: Sequência de imagens utilizadas no registro da Atividade Locomotora. A) Imagem do campo aberto em ambiente claro, usada para calibração do sistema; B) Exemplo de imagem do rato em livre movimentação no campo aberto, registrada em ambiente escuro; C) Máscara fabricada no computador sobre o registro do campo aberto em ambiente claro, utilizada para isolar a imagem do animal no campo dos objetos ao redor; D) Imagem final, usada no processamento e cálculos.

A série de imagens *.TIFF são convertidas para o formato monocromático e em seguida binarizadas. Em cada novo quadro agora obtido, ocorre um mapeamento dos valores de *pixels*. Usando o algoritmo apropriado se encontra os valores referentes ao centro de massa do animal estudado e então sua coordenada cartesiana é arquivada.

Por análise comparativa, quadro a quadro, é feita a operação matemática da distância entre dois centros de massa entre quadros sucessivos, obtendo-se então a distância percorrida entre quadros. Somando-se todas as distâncias quadro a quadro obtém-se a distância total percorrida pelo animal no experimento e com esse dado o *PROCESS* gera o gráfico correspondente.

Então, através da informação disponível do intervalo do tempo entre quadros, é possível se obter a velocidade média desenvolvida entre quadros. Seguindo o raciocínio da distância entre quadros, e diferenciando deste apenas por realizar a divisão desse valor pelo tempo, o *PROCESS* fornece a informação da velocidade média entre quadros e velocidade média total. Através da massa fornecida ao sistema por meio da interface sistema/operador, é possível calcular a energia cinética e potência muscular desenvolvidas pelo animal monitorado. Utiliza-se para esse cálculo a aproximação do animal a um objeto pontual dotado de massa, onde, movimentos rotacionais, como os da cabeça do animal, em que não ocorre deslocamento do centro de massa são desprezados. Levando em conta apenas movimentos translacionais do centro de massa, considera-se que toda a energia cinética associada ao percurso decorre da energia potencial muscular do animal.

Após processamento das imagens e registro de dados se obtêm todos os parâmetros salvos em arquivo no formato *.DAT. O arquivo citado pode ser analisado na plataforma EXCEL.

Assim, de posse da trajetória percorrida, do intervalo de tempo entre os quadros e da massa do animal, foi possível calcular a distância percorrida, a velocidade média, a potência muscular, o número de paradas e o período de tempo em que o animal permaneceu parado durante o intervalo de registro.

4.2.3 Análise dos Resultados

Os dados foram analisados estatisticamente através do software StatGraphics®.

Para avaliação dos efeitos da idade (maturação), foi realizada uma Análise de Variância One-way em cada grupo, Normal ou Desnutrido. Quando indicada a diferença estatística, foi realizado um Teste de Comparações Múltiplas (Fischer's Least Significant Difference), para identificar a diferença estatística entre as diversas idades de avaliação.

Na avaliação sobre os efeitos da desnutrição, foram comparados os dados de cada idade, entre os grupos Normonutrido e Desnutrido, com o Teste de Comparações Múltiplas. No grupo N, houve um aumento progressivo da massa corporal com a idade ($p=0,000$). O mesmo foi observado no grupo D. Apenas entre o 14º e 17º dias de idade não se observou aumento significativo da massa, em ambos os grupos.

Na comparação entre N e D, a massa corporal apresentou-se menor neste último, em todas as idades avaliadas (figura 14).

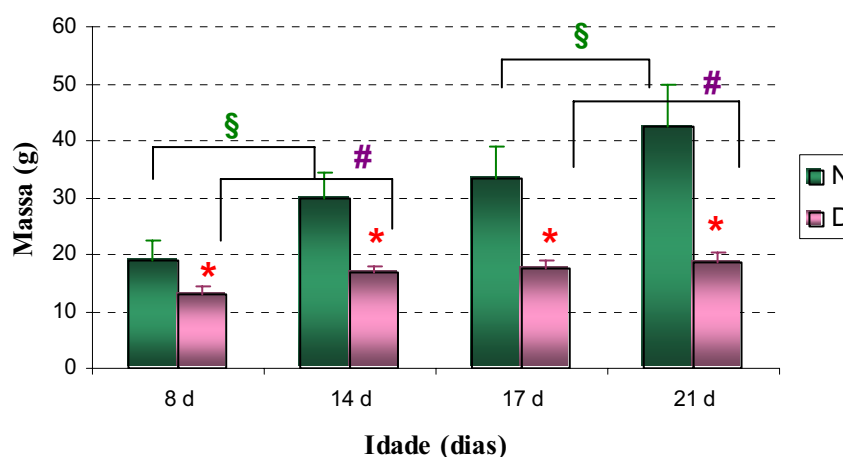


Figura 14 – Evolução ponderal de ratos normo (N) ou desnutridos (D) durante o período de aleitamento, durante a avaliação da AL, no 8º, 14º, 17º e 21º dias pós-natais. Os resultados foram expressos em média $\pm$ DP. § = $p < 0,05$ (grupo Normal, ANOVA One-Way). # = $p < 0,05$ (grupo Desnutrido, ANOVA One-Way). * = $p < 0,05$ (Comparação entre grupos, Teste de comparações Múltiplas).

Na avaliação da Distância Percorrida, o grupo Normonutrido apresentou aumento com a idade ($p=0,000$), entretanto não se observou diferença entre o 17º e o 21º dias de idade. No grupo Desnutrido também houve aumento neste parâmetro, com diferença em todas as idades. Na comparação entre N e D, observou-se uma tendência a diminuição na distância percorrida aos 8 e aos 14 dias, entretanto, essa tendência se inverteu, com aumento nos desnutridos aos 21 dias pós-natais (figura 15).

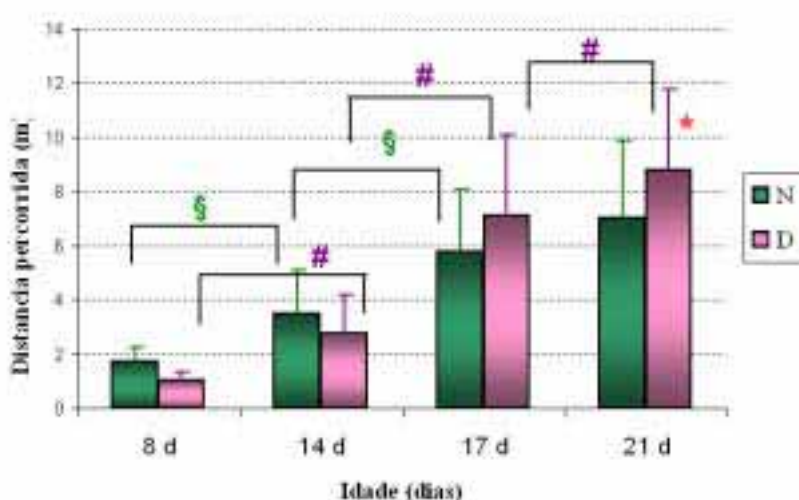


Figura 15.– Evolução da distância percorrida (m) por ratos normo (N) ou desnutridos (D) durante a avaliação da AL, no 8º, 14º, 17º e 21º dias pós-natais. Os resultados foram expressos em média $\pm$ DP. § = $p < 0,05$ (grupo Normal, ANOVA One-Way). # = $p < 0,05$ (grupo Desnutrido, ANOVA One-Way). * = $p < 0,05$ (Comparação entre grupos N e D, Teste de Comparações Múltiplas).

No parâmetro Velocidade Média, ambos os grupos apresentaram aumento progressivo com a idade ($p=0,000$), com diferenças entre cada uma das idades avaliadas. Na comparação entre N e D, observou-se a mesma tendência do parâmetro anterior, com aumento significativo da velocidade no 21º dia de idade (figura 16).

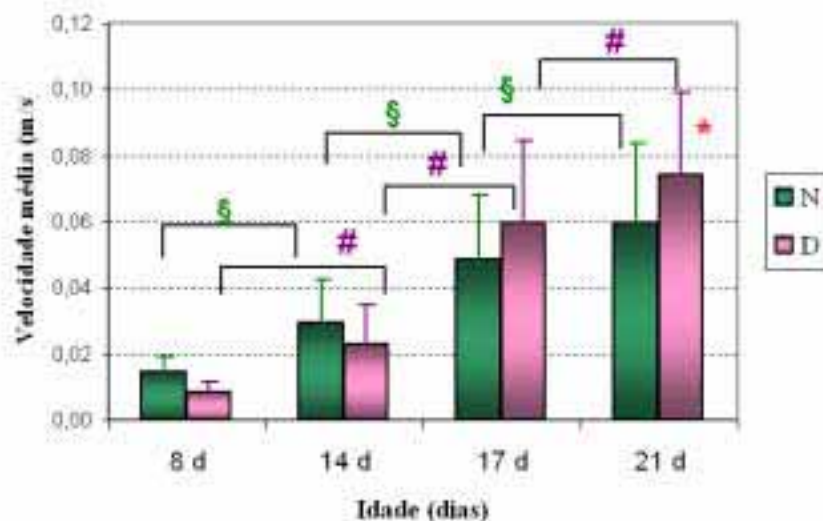


Figura 16 – Evolução da Velocidade Média desenvolvida por ratos normo (N) ou desnutridos (D) durante a avaliação da AL, no 8º, 14º, 17º e 21º dias pós-natais. § = $p < 0,05$ (grupo Normal, ANOVA One-Way). # = $p < 0,05$ (grupo Desnutrido, ANOVA One-Way). * = $p < 0,05$ (Comparação entre grupos N e D, Teste de Comparações Múltiplas).

A Potência Média apresentou aumento progressivo ($p=0,000$) com a idade nos dois grupos nutricionais, porém no grupo N não houve diferença entre o 8º e o 14º dias de idade. Comparado ao grupo N, o D apresentou redução neste parâmetro no 17º e 21º dias (figura 17).

Ao avaliar o tempo em que o animal ficou parado durante o período de registro, verificou-se uma redução progressiva ($p=0,000$) em ambos os grupos, embora a diferença não tenha sido significativa entre o 17º e o 21º dias no grupo N. Os animais N apresentaram tempo de parada maior em comparação aos D, no 17º e 21º dias pós-natais ($p < 0,05$) (figura 18).

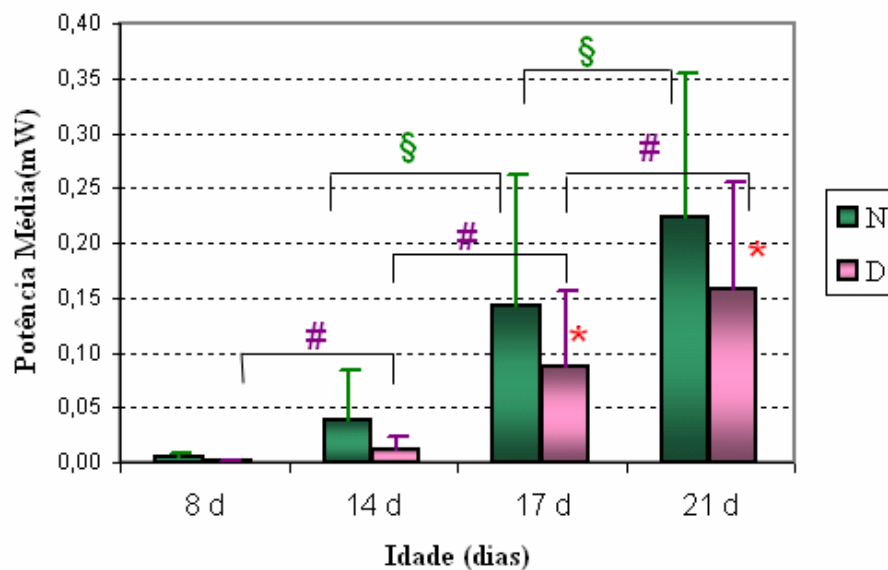


Figura 17: Evolução da Potência Média apresentada por ratos normo (N) ou desnutridos (D) durante a avaliação da AL, no 8º, 14º, 17º e 21º dias pós-natais. § = $p < 0,05$ (grupo Normal, ANOVA One-Way). # = $p < 0,05$ (grupo Desnutrido, ANOVA One-Way). * = $p < 0,05$ (Comparação entre grupos N e D, Teste de Comparações Múltiplas).

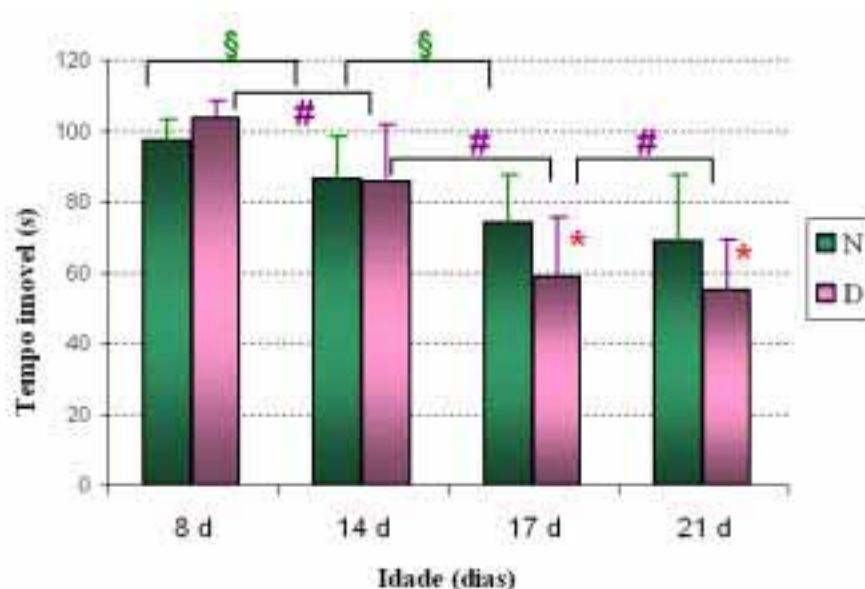


Figura 18.: Duração do Tempo em que o animal permaneceu parado durante a avaliação em ratos normo (N) ou desnutridos (D), durante a avaliação da AL, no 8º, 14º, 17º e 21º dias pós-natais. § = $p < 0,05$ (grupo Normal, ANOVA One-Way). # = $p < 0,05$ (grupo Desnutrido, ANOVA One-Way). * = $p < 0,05$ (Comparação entre grupos N e D, Teste de Comparações Múltiplas).

A quantidade de vezes que o animal interrompeu sua movimentação foi também avaliada. Não houve alterações no grupo N, no decorrer das diferentes idades avaliadas ($p=0,09$). No grupo D, o número de paradas aumentou entre o 8º e o 14º dias pós natais, porém diminuiu entre o 17º e o 21º dias ($p=0,000$). Não houve diferença entre o 14º e 17º dias. Na comparação entre N e D, observou-se no D redução do número de paradas apenas no 8º dia de idade (figura 19).

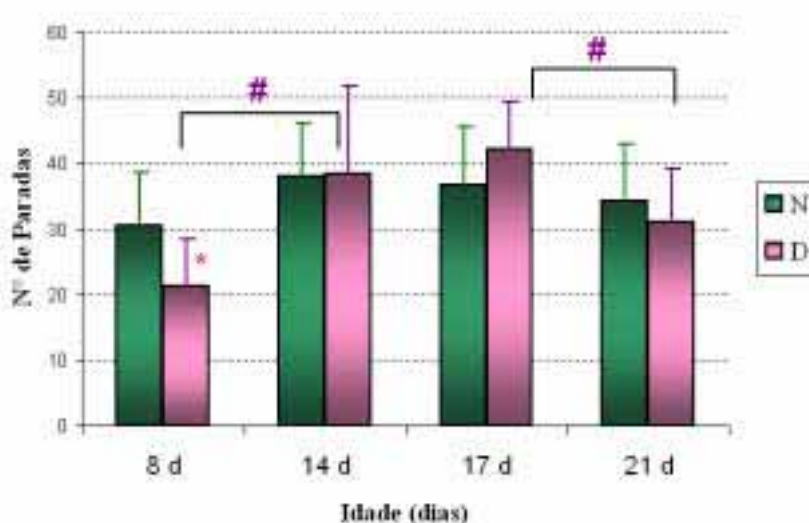


Figura 19: Número de paradas apresentado por ratos normo (N) ou desnutridos (D) durante a avaliação da AL, no 8º, 14º, 17º e 21º dias pós-natais. § = $p < 0,05$ (grupo Normal, ANOVA One-Way). # = $p < 0,05$ (grupo Desnutrido, ANOVA One-Way). * = $p < 0,05$ (Comparação entre grupos N e D, Teste de Comparações Múltiplas).

4.2.4 Discussão

Foi igualmente observada, neste estudo, uma redução da massa corporal dos animais que foram alimentados por mães que receberam dieta hipoprotéica. Este dado corrobora com outros achados de estudos que utilizaram desnutrição no período do

aleitamento em ratos (Smart e Dobbing, 1971; Silvado e Werneck, 2006; Barros et al, 2006).

A potência média desenvolvida por ambos os grupos nutricionais aumentou gradativamente no período estudado, mas nos animais desnutridos apresentou-se reduzida nas idades de 17 e 21 dias, comparada ao grupo normonutrido. Este fato pode ser justificado como consequência da redução da massa corporal, assim como pela redução da área de secção transversa do músculo, uma vez que, a potência desenvolvida por um corpo é diretamente proporcional à massa do mesmo. A literatura relata que restrições nutricionais induzidas na primeira semana pós-natal em porcos levam a redução na área de secção transversa apenas de fibras rápidas, como visto no músculo Longuíssimo Lombar (Lefaucheur et al, 2003). Em ratos, submetidos à desnutrição pelo método de grandes ninhadas, os resultados foram semelhantes no músculo solear (Silvado e Werneck, 2006).

O padrão observado na evolução da atividade locomotora, de acordo com os parâmetros observados no presente estudo, foi semelhante nos dois grupos nutricionais: houve um aumento gradual na distância percorrida e na velocidade média do movimento desenvolvido, enquanto que o tempo em que o animal permanecia parado durante o período de registro ia gradativamente diminuindo, com o avançar da idade.

Entretanto, quando avaliadas a distância percorrida e a velocidade média desenvolvida pelos animais desnutridos, verifica-se que nas primeiras duas semanas houve tendência a redução nestes valores, sem diferença estatística segundo o método aqui utilizado. Surpreendentemente, tanto a distância quanto a velocidade média apresentaram-se aumentadas no grupo desnutrido quando comparados aos animais normonutridos, no final da 3ª semana pós-natal. Em relação ao tempo de imobilidade, ao contrário, houve uma redução no grupo desnutrido.

Barros et al (2006) demonstraram um atraso na ontogenia de reflexos em animais desnutridos. É interessante observar que os reflexos se constituem como uma primeira experiência motora no neonato, e favorecem a evolução de padrões motores mais maduros. Nagy et al (1977), por sua vez, observaram um aumento, a partir do 17º dia de vida pós-natal, na atividade locomotora de ratos desnutridos. Entretanto, este achado foi associado a um retardo na maturação de estruturas do SNC que modulam a expressão do movimento voluntário, as quais agiriam principalmente pela inibição de movimentos associados, ou seja, favorecendo a expressão de movimentos ordenados.

Estudos comportamentais podem ajudar a estabelecer uma ligação entre comportamentos extremamente precoces na vida pós-natal e o desenvolvimento motor. Salas *et al* (1998), utilizando um modelo de desnutrição materna neonatal, verificaram que, além do prejuízo ao crescimento da ninhada, ocorria uma alteração nos parâmetros de comportamento entre mãe-filhotes, caracterizada por diminuição nas atitudes que representavam cuidado e estimulação materna. A atitude posterior destes animais, de aumento do período dispendido em comportamentos de limpeza (*self-grooming*), segundo os autores, demonstra uma interação social reduzida ou uma redução do estado de motivação, numa fase em que estes servem de alavanca para a iniciação de diversas habilidade, inclusive a dos movimentos. Provavelmente contribuiu para essa redução nos comportamentos de interação entre os filhotes e o ambiente a redução inicial da atividade locomotora, que foi a observação do presente trabalho. Consequentemente, toda a atividade exploratória pode sofrer prejuízo.

Por outro lado, estudos sobre comportamento alimentar neonatal demonstraram que se a desnutrição é imposta durante o período de aleitamento, ocorre uma modificação na proporção de tempo dedicada aos diferentes comportamentos, tanto materno, quanto da ninhada (Lopes de Souza et al, 2003). Observou-se um maior tempo

gasto durante a sucção, numa provável tentativa de aumentar a disponibilidade de leite para os filhotes. Entretanto, isto reduziu a expressão de comportamentos maternos, como descanso e alimentação, com provável prejuízo à própria nutrição materna (Lopes de Souza et al, 2003). Pode-se inferir daí que o aumento no tempo de imobilidade nos filhotes se expressa como redução no tempo de atividade espontânea, o que representa menores possibilidades de integração sensorio-motora, essencial para a maturação de padrões locomotores. Nesse sentido, já foi demonstrado que a hipoatividade induzida durante o período de aleitamento, especialmente na segunda semana de vida, levou a alterações duradouras no padrão de marcha em ratos (Walton et al, 1992).

É interessante observar que existem achados de maior labilidade emocional em ratos desnutridos, conforme relatado por Sobotka, Cook e Brodie (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.

No trabalho de Teodósio et al (1979), foi relatado que ratos desnutridos no período neonatal apresentavam comportamentos motores diferentes se comparados aos seus pares normonutridos. Os autores descreveram tais alterações como uma consequência de modificações no comportamento emocional, com exacerbação de respostas antecipatórias relacionadas ao stress. Dessa maneira, o rato apresenta um aumento na movimentação voluntária, mas sem propósitos definidos, como por exemplo uma locomoção direcionada. Estes achados poderiam explicar o fato de termos encontrado uma diminuição no tempo de repouso de ratos desnutridos. Estes animais passariam mais tempo se movimentando, porém não apresentando uma intencionalidade exploratória.

No mesmo sentido, Smart e Dobbing (1971) observaram um aumento em movimentos rotatórios em ratos desnutridos, o que influenciaria de forma negativa o desenvolvimento de um padrão organizado de movimentos. Segundo Lynch et al (1975), o crescimento do cerebelo foi severamente afetado pela desnutrição neonatal, tendo os animais desnutridos apresentado padrões motores inapropriados para as situações motoras testadas. Quedas e tropeços também foram associados à desnutrição, naquele mesmo estudo e os autores associam fatores emocionais às dificuldades apresentadas (Lynch et al, 1975).

Dessa forma, o aumento da distância percorrida e da velocidade nos desnutridos, encontrados no presente estudo, podem ser mais fortemente relacionados a uma movimentação advinda de uma agitação emocional e da diminuição do tempo dispendido na atividade exploratória. Evidentemente, um conjunto de alterações no desenvolvimento de padrões de marcha ocorreu, e diversos fatores podem ter contribuído, levando em consideração um atraso inicial deste desenvolvimento.

Embora estudos em animais neonatos sejam raros, experimentos com ratos adultos submetidos a hipoatividade demonstraram alterações nas propriedades elásticas do músculo-tendinoso (Canon e Goubel, 1995; Almeida-Silveira et al, 2000). As alterações descritas por Walton et al (1992) na marcha de ratos submetidos ao método de suspensão no período neonatal, caracterizadas por modificações nos ângulos articulares e excessiva abdução nas patas posteriores, poderiam estar relacionadas às alterações contráteis e elásticas em músculos. Uma outra hipótese seria de que essas modificações da biomecânica muscular poderiam influenciar negativamente o padrão de marcha em ratos desnutridos. Os resultados do próximo estudo deste trabalho tentarão correlacionar melhor as possíveis alterações na biomecânica muscular com as alterações motoras.

4.3 Estudo do desenvolvimento neonatal e das adaptações do tecido muscular esquelético

RESUME EN FRANCAIS : (IV. TROISIEME ETUDE)

4.3 ETUDE DES CONSEQUENCES DE LA DENUTRITION NEONATALE SUR LES MUSCLES STRIES SQUELETTIQUES PENDANT LA CROISSANCE

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

4.3.1 Animaux

Les procédures pour obtenir les portées et les groupes nutritionnels sont les mêmes des études antérieures. Après sevrage, les rats ont été utilisés soit à l'âge de 25 jours, soit à 90 jours pour la caractérisation des propriétés biomécaniques musculaires.

4.3.2 Matériel et Méthode d'évaluation Biomécanique

Les rats sont anesthésiés pour la procédure de prélèvement des muscles soléaire et EDL, qui seront utilisés soit pour l'analyse histologique, soit pour la caractérisation de propriétés biomécaniques.

Aussitôt après prélèvement, le muscle est pesé puis placé dans une chambre contenant une solution de Ringer oxygénée et thermostatée à 25°C.

L'extrémité proximale du muscle est attachée à une tige métallique reliée au vibreur électromagnétique et son extrémité distale est attachée à un capteur de force (figure 20).

Pour les tests en actif, le muscle est ajusté à sa longueur optimale - L0, définie par la longueur où la tension maximale est développée lors du twitch. Des séries de double controlled release (figure 21) ont été réalisées à partir de la tension tétanique afin d'établir la relation force-vitesse et la

relation tension-extension. Par ailleurs, des tests de fatigue selon le protocole décrit par Burke (1973) ont été effectués.

Pour les tests en passif, le muscle est ajusté à sa longueur L_s , longueur correspondant à une tension passive de 5 à 8 mN. A partir de cette longueur, un premier test de relaxation consistant à étirer le muscle de 15% de sa longueur et à maintenir cette longueur pendant 80 secondes est réalisé (figure 23). Un second test en rampe consistant à étirer le muscle à une vitesse de 0.2mm/s jusqu'à 15 à 20% de L_s est effectué (figure 24). Pour chaque test, trois essais ont été réalisés afin d'éliminer le comportement thixotropique du muscle et seul le troisième essai a été analysé.

La composante contractile (CC) a été évaluée à travers la force développée lors d'un twitch et lors d'un tétanos, la cinétique du twitch (temps de contraction - CT et temps de demi relaxation - HRT), l'index de résistance à la fatigue (rapport entre force développée à la $N^{\text{ème}}$ contraction et la première contraction lors du test de fatigue) et la vitesse maximale de raccourcissement.

La Composante élastique série (CES) a été évaluée par le calcul des compliances, l'énergie potentielle et l'extension maximale à partir des relations tension-extension.

La Composante Élastique Parallèle (CEP) a été évaluée par le calcul des forces dynamiques et statiques relativisées par le poids musculaire obtenues lors du test de relaxation et par la force relativisée par rapport au poids du muscle à 14% de déformation obtenue lors du test en rampe.

4.3.3 Matériel et Méthode d'évaluation histochimique

La technique utilisée pour l'analyse hystochimique est celle de la Myosine ATPase. Des coupes de 10 μ m d'épaisseur ont ainsi été colorés après pré incubation à différents pH afin d'identifier les différents types de fibres et de déterminer, pour chaque type, la surface de section moyenne.

4.3.4 Analyse des résultats

Poids corporel et musculaire :

Le poids corporel a augmenté avec l'âge pour le groupe N ($95,2 \pm 2,4$ g à 25 jours et $460,1 \pm 14,6$ g à 90 jours, $p < 0.05$), ainsi que pour le groupe D ($55,8 \pm 6,73$ g à 25 jours et $363,5 \pm 28,59$ g à 90 jours. ($p < 0,05$). La dénutrition a entraîné une baisse du poids, qui persiste à 90 jours.

Le poids des muscles Soléaires et EDL augmente avec l'âge. Les poids des deux muscles sont inférieurs chez les animaux dénutris à 25 et 90 jours. Par contre, si les poids musculaires sont relativisés par rapport au poids corporel, les rapports poids musculaire/poids corporel ne sont pas modifiés par la dénutrition sauf pour les soléaires de 90J (figures 25 et 26).

Caractéristiques de la composante contractile :

A 25 jours, la dénutrition entraîne une réduction de la force développée lors du twitch et lors du tétanos dans les deux muscles alors qu'à 90 jours, seul l'EDL des rats dénutris a une force développée inférieure aux EDL des rats normonutris. Lorsque la force tétranique est relativisée par rapport au poids du muscle, aucune différence n'est observée sur les soléaires de 25 et 90 jours ; par contre on peut noter une augmentation de ce paramètre sur les EDL de 90 jours (tableau 2). La dénutrition n'a pas modifiée les cinétiques du twitch excepté pour les soléaires de 25 jours pour laquelle CT et HRT sont augmentés.

Les tests de fatigue ont montré une augmentation de la résistance à la fatigue liée à la dénutrition sur les seuls muscles soléaires de 25 jours (tableau 3).

La vitesse maximale de raccourcissement est augmentée sous l'effet de la dénutrition dans les muscles soléaires et EDL de 25 jours uniquement (figure 27).

Caractéristiques de la CES :

La dénutrition n'a pas modifié les caractéristiques de la CES des soléaires et EDL de 25 et 90 jours. Seule l'extension maximale est augmentée sous l'effet de la dénutrition sur les soléaires de 25 jours (tableau 4).

Caractéristiques de la CEP :

La détermination des contraintes passives pour les deux tests réalisés montrent une augmentation de la raideur des muscles soléaires et EDL à 25 jours ; aucune différence dans ces paramètres est observée entre les muscles dénutris et normonutris à 90 jours (tableau 5 et 6).

Caractéristiques typologiques :

La dénutrition n'a pas entraîné une modification dans la distribution des différents types de fibres dans les deux muscles aux deux âges étudiés. Par contre, la surface de section des différents types de fibres sont inférieurs dans les muscle dénutris par rapport aux muscles normonutris.

4.3.5 Discussion

La dénutrition entraîne une réduction de poids musculaire à 25 et 90 jours alors qu'une réduction de la force développée n'est observée qu'à 25 jours pour les soléaires et à 25 et 90 jours pour les EDL, révélant ainsi un effet différent de la dénutrition précoce sur le muscle tonique et le muscle phasique. Cette différence observée peut être attribuée à une plus grande sensibilité des fibres rapides à la privation nutritionnelle telle que l'a noté Lefaucheur et al (2003). De plus, l'augmentation de la force tétanique relative observée sur l'EDL de 90 jours peut signifier une plus grande activité locomotrice des rats dénutris, augmentation qui a été observée dans l'étude précédente.

Les modifications dans la cinétique du twitch observées sur le soléaire de 25 jours des rats dénutris sont à relier à d'éventuelles altérations dans les cinétiques calciques dans la mesure où ni les caractéristiques hystologiques, ni les caractéristiques de la CES sont modifiées par la dénutrition. Dans ce sens, Harrison et al (1996) ont montré une réduction de la concentration de pompe calcique présente au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique liée à la un état d'hypothyroïdisme semblable à la dénutrition.

L'augmentation de la résistance à la fatigue observée sur les soléaires de 25 jours dénutris sont en opposition avec les résultats de Bissonette et al (1997) et de Lefaucheur et al (2003) alors qu'une telle

augmentation a été rapportée par Brozanski et al (1993) et Wank et al (2000). Ces deux dernières études, qui se rapprochent plus de nos conditions expérimentales du point de vue de la période pendant laquelle la dénutrition est imposée, laissent suggérer des modifications dans le métabolisme musculaire. Ainsi, une préservation voire une augmentation de la capacité oxydative dans les fibres lentes des animaux dénutris a été rapportée (Lefaucheur et al, 2003 ; White et al, 2000).

On note une augmentation de V_{max} dans les muscles soléaires et EDL de 25 jours des animaux dénutris. Cette augmentation est surprenante de part la non modification des caractéristiques typologiques des muscles par la dénutrition. Cependant, la technique utilisée pour la caractérisation des fibres musculaires ne permet pas de révéler les fibres embryonnaires et/ou néonatales, proportion de fibres pouvant être importante dans les muscles dénutris de 25 jours. En effet, la persistance de l'expression de formes embryonnaires et indifférenciées a été rapportée par Lefaucheur et al (2003) et par White et al (2000). Selon Harrison et al (1996), une réduction de l'hormone T3 semblable à celle liée à la dénutrition entraîne aussi un retard dans la différenciation des fibres. Enfin, une altération du rapport des chaînes légères de myosine MLC3f/MLC2f pourrai aussi influencer la V_{max} , Bottinelli et al (1994) ayant montré l'influence de ce rapport sur la vitesse de raccourcissement sous charge nulle dans les fibres rapides.

Les caractéristiques de la CES ne sont pas modifiées par la dénutrition. Par des techniques d'hypo ou d'hyperactivité, une augmentation de la compliance de la CES est généralement associée, au moins en partie, à une augmentation de la proportion du muscle en fibre rapide, augmentation qui entraîne par ailleurs une augmentation de la V_{max} (Pousson et al, 1991 ; Canon et Goubel, 1995). Dans notre étude, il a été montré une augmentation de la V_{max} sans modification visible des caractéristiques histologiques des muscles dénutris à 25 jours. Si, comme il est suggéré plus haut, il y a un retard dans le processus de maturation des fibres mais qui n'aurait pu être identifié par la technique histologique utilisée, il pourrait alors y avoir une modification de la compliance de la partie active de la CES qui serai alors compensée par une modification

inverse de la compliance de la partie passive de la CES. Cette hypothèse est confortée par l'augmentation de raideur de la CEP observée chez les muscles du même âge sous l'effet de la dénutrition, augmentation pouvant être due à une augmentation du contenu en collagène aussi bien dans le muscle que dans le tendon représentant la partie passive de la CES.

Comme il est suggéré plus haut, l'augmentation de la raideur de la CEP des muscles de 25 jours due à la dénutrition peut être la conséquence d'une augmentation de la quantité de collagène musculaire et/ou à une modification de la protéine de Titine ou des protéines de structure.

4.3.1 Obtenção dos Animais e Grupos Experimentais

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

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

Os animais utilizados em experimentação na UTC receberam a dieta padrão local (Teklab – HARLAN[®], contendo 18% de proteína). Após o nascimento dos filhotes, as fêmeas lactantes que iriam formar o grupo Desnutrido (D) passaram a receber a dieta hipoprotéica durante todo o período de aleitamento. As ninhadas foram constituídas segundo os mesmos critérios expostos no item **4.1.1**.

Após o desmame, as ratas-mães foram sacrificadas e seus filhotes passaram a receber a dieta padrão do biotério, até completarem as idades onde a avaliação das propriedades biomecânicas do músculo esquelético seriam realizadas, aos 25 ou 90 dias pós-natais.

4.3.2 Materiais e Métodos de Avaliação Biomecânica

Os ratos foram anestesiados, via intraperitoneal, com pentobarbital de sódio (3mg/100g de peso corporal do animal). A partir de uma incisão longitudinal na face lateral da pata posterior, o músculo solear ou o extensor longo dos dedos (EDL) são dissecados e seccionados nos tendões, para utilização na análise histológica ou biomecânica.

O músculo é cuidadosamente excisado da pata do animal, pesado em balança digital (Sartorius CP64[®], máximo 64g, divisão 0,1mg) e colocado em uma câmara contendo solução de Ringer (em millimoles: NaCl 115, NaHCO₃ 28, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 3.1, KCl, 3.5, KH₂PO₄ 1.4, Glicose 11.1) mantido a 25°C e com pH de 7.3. A solução recebe constantemente uma mistura de gases de 95% de O₂ e 5% CO₂.

Dentro desta câmara, que faz parte do ergômetro (figura 20), o músculo é montado horizontalmente, com a parte distal fixada a um transdutor de força. Sua extremidade proximal será conectada a um captor de deslocamento, parte móvel de um módulo vibrante eletromagnético, que vai permitir o controle de alterações no comprimento durante a contração isométrica. O músculo é ajustado a um comprimento ótimo (L_0), definido como o comprimento no qual a tensão de twitch máxima (P_t) será desenvolvida.

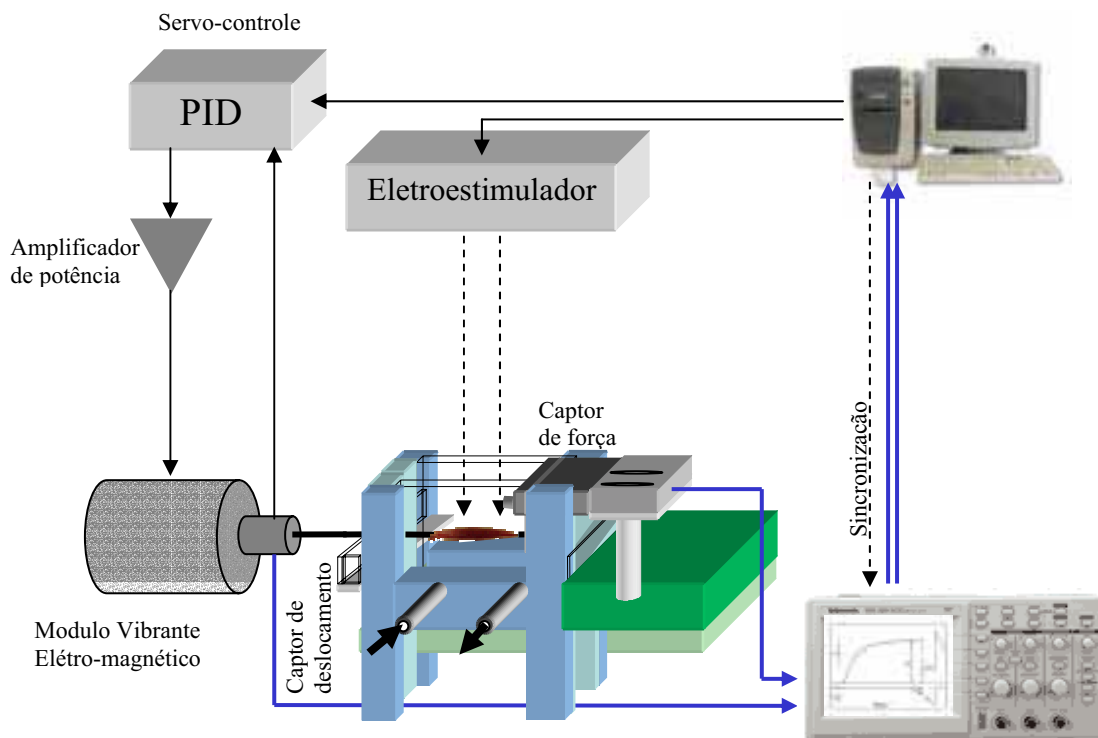


Figura 20: representação esquemática dos componentes do ergômetro para avaliação do músculo isolado.

Um estímulo tetanizante de frequência ótima (80 Hz) será liberado com duração determinada segundo o músculo avaliado, em intervalos de 5 min para dois eletrodos de prata em paralelo, colocados dentro da cuba que contém o músculo, e conectados com polaridade alternada para evitar eletrólise. Os pulsos serão supramáximos (estímulos elétricos numa intensidade máxima, para garantir que todas as fibras estarão respondendo) e com duração de 0,5 ms.

Características contráteis e elásticas foram avaliadas utilizando uma série de duplas liberações no comprimento imposto ao músculo, a partir de L_0 . O movimento do ergômetro é disparado quando a tensão tetânica (P_0) está completamente desenvolvida (800ms ou 400 ms após o início da estimulação do solear ou EDL, respectivamente). Uma primeira liberação ocorre de forma rápida (30 cm.s^{-1}), ocasionando uma queda na

força, sendo o valor mínimo de força P mensurado. Imediatamente após esta primeira liberação, o músculo é novamente encurtado numa velocidade (V) constante, ajustada de forma a se obter um platô na linha de registro da tensão que é desenvolvida (Figura 21).

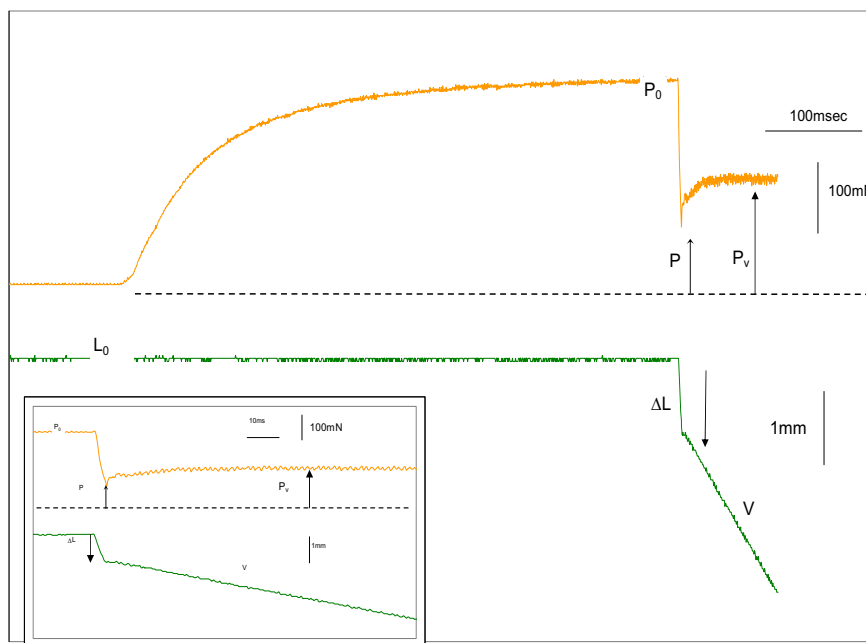


Figura 21 : Curva típica de força obtida para a relação força/velocidade, durante o teste de *double controlled release*. O traçado inferior (em verde) indica a variação de comprimento do músculo durante o teste: contração isométrica, seguida de liberação rápida do comprimento (ΔL) e uma segunda liberação a velocidade constante (V). O traçado superior (em laranja), indica a variação de força durante o platô tetânico (P_0), e no momento das liberações de comprimento (P e P_v)

Para testar a resistencia do CES, as curvas de tensão-extensão foram construídas a partir da variação de comprimento normalizado em relação ao L_0 ($\Delta L/L_0 \cdot 10^2$), versus a tensão relativizada (P/P_0), conforme apresentado nas figuras 2 e 3 (Introdução, parte 1.1.2), através de 10 a 15 liberações de diferentes amplitudes. Os dados são inseridos em uma função polinomial de 3ª ordem e a rigidez do músculo será avaliada computando a relação ($\Delta l / \Delta P$) a uma P_0 e $0,2 P_0$ e a extensão máxima (Δl_{max}), isto é, a liberação mínima requerida para se obter uma tensão igual a zero.

A área sob a curva, que representa a energia potencial máxima armazenável no CES, foi também calculada. De acordo com a equação de Hill (1938), $[(P + a)(v + b) = (P_0 + a)b]$, uma linearização da curva velocidade-força será desenvolvida colocando para cada isovelocidade de encurtamento (v) a tensão normalizada (P/P_0), versus a proporção $(P_0 - P) / v \cdot P_0$. Os dados foram inseridos em uma função linear e a velocidade máxima de encurtamento (V_{max}) foi computada utilizando análise de regressão. As medidas das características contráteis do músculo também incluem a análise do tempo de contração (CT), do tempo de meio-relaxamento (HRT) e da força obtida (P_t) durante o twitch (figura 22).

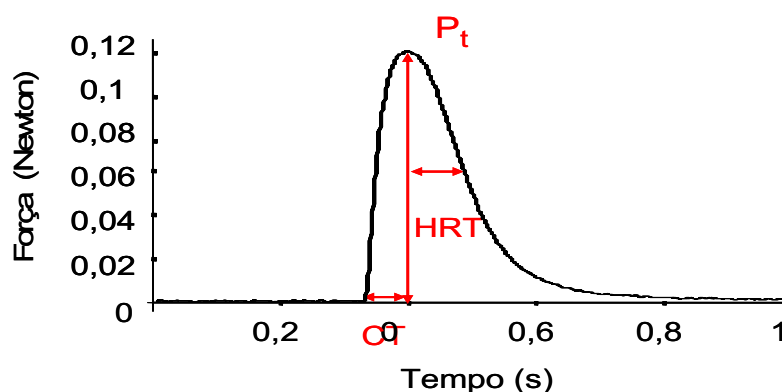


Figura 22: Representação gráfica do traçado obtido durante o teste de Twitch (CT = tempo de contração; HRT = valor obtido a 50% do tempo de relaxamento; P_t = força máxima)

O teste de fadiga foi realizado através de um protocolo semelhante ao descrito por Burke (1973). Pulsos com frequência de 40Hz e 330 ms de duração foram aplicados durante dois minutos, sendo um pulso a cada segundo. A resistência à fadiga foi quantificada através da mensuração da tensão produzida a cada 5 segundos. O índice de resistência foi calculado como a tensão produzida a cada 30 s (ou seja, 30, 60, 90 e 120 seg após o início do teste), dividida pela tensão produzida durante o primeiro segundo.

Para avaliação dos músculos em estado passivo (CEP), os músculos foram posicionados no ergômetro num comprimento denominado de *Slack* (L_s), ou seja, aquele no qual se observa o início do desenvolvimento da tensão passiva, o que se verifica com auxílio de um osciloscópio. Convencionou-se como tensão média para o início de cada teste o valor de 5 a 8 mN. Na avaliação do CEP foram realizados dois testes.

O primeiro teste, chamado de relaxamento, consiste em aplicar um único estiramento rápido (160 mm/s) a partir de L_s (14% da L_s), mantendo-o nessa extensão por um período de 80 s, para então ser relaxado à posição inicial L_s . A resposta deste teste é caracterizada por um pico de força, denominado F_d ou força dinâmica, que é o primeiro dado a ser analisado. Um segundo ponto característico corresponde à força atingida no final do platô de estiramento, onde se observa um relaxamento: trata-se da força estática ou F_s (Figura 23).

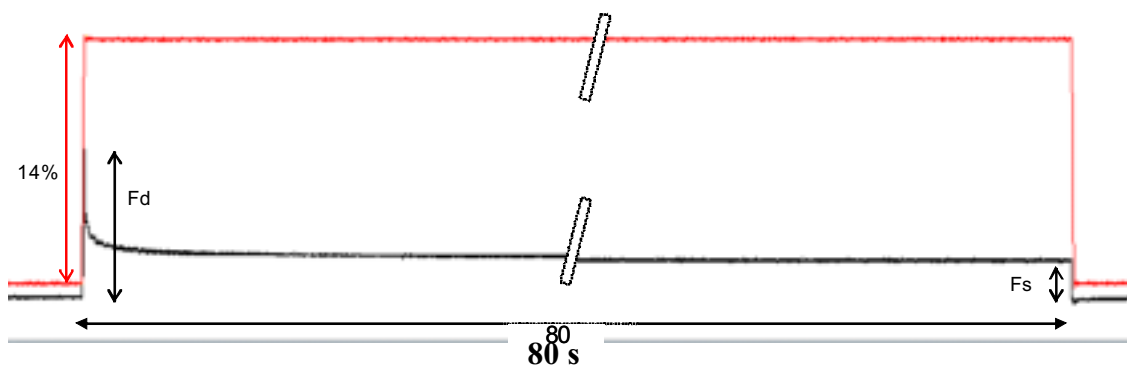


Figura 23 - Representação esquemática do Teste de Relaxamento, indicando o estiramento mantido (linha superior) e as forças desenvolvidas pelo músculo, Dinâmica (F_d) e Estática (F_s) (linha inferior).

O segundo teste é o chamado Estiramento em Rampa, ou “quase-estático”. A partir do L_s , o músculo é lentamente estendido, a uma velocidade de 0,2mm/s, até atingir um estiramento de 14% de sua L_s . A partir deste máximo, sem que houvesse manutenção de um platô, o músculo retorna lentamente, na mesma velocidade de

0,2mm/s, ao seu comprimento L_s . Para a análise, levou-se em consideração a força desenvolvida durante o pico de estiramento (Figura 24).

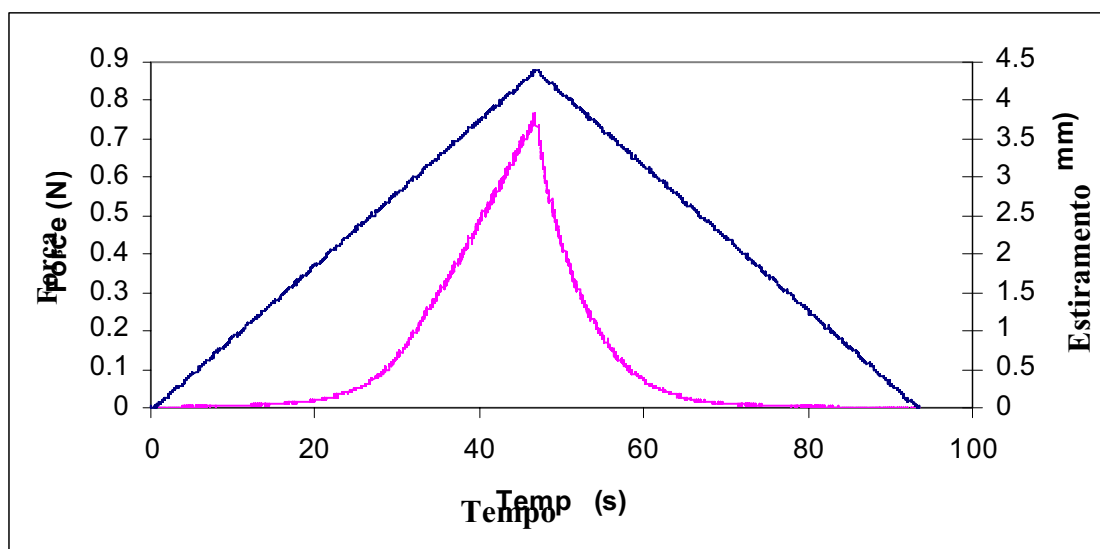


Figura 24 - Representação esquemática do Teste de Estiramento Quase Estático, indicando o estiramento lento (superior) e o pico de força desenvolvida pelo músculo (F_s) (inferior).

Cada teste era repetido três vezes, guardando-se um intervalo de 5 minutos de repouso entre cada um. Os dados da última avaliação em cada teste foram utilizados para análise, sendo os dois primeiros estiramentos realizados para limitar artefatos decorrentes da tixotropia. O valor máximo de 14% estiramento foi escolhido após algumas tentativas em experimentos-piloto: embora seja descrito na literatura valores maiores de estiramento (Bensamoun et al, 2006), foi verificado em nossos ensaios que os músculos de ratos jovens, particularmente os desnutridos, não suportavam bem tal estresse mecânico, chegando a sofrer danos estruturais ou até mesmo a se partir.

Além dos valores de força F_d e F_s , para a avaliação da tensão desenvolvida pelo músculo em resposta ao estiramento passivo é necessário utilizar algum método de relativização. Embora os valores de força muscular sejam usualmente relativizados por meio da área teórica de secção transversal, o fato de serem utilizadas duas idades onde o

crescimento do animal toma proporções importantes foi discutido antes de se resolver pela maneira através da qual a força muscular seria normalizada. A equação para determinar a área teórica de secção transversal de um músculo é $L_0 \cdot M / 0,62 \cdot 1,06$ onde L_0 é o comprimento do músculo, M a massa, 0,62 uma constante para o músculo solear (para o EDL utiliza-se 0,44) e 1,06 um valor constante. Levando em consideração que esta fórmula foi desenvolvida para um músculo adulto, o que torna seu uso questionável nos animais neonatos, que L_0 teve pouca variação intra-grupos e que a massa do músculo faz parte desta forma de avaliação, consideramos mais adequado utilizar a relativização da tensão passiva (F) desenvolvida com relação ao peso do músculo (pM), ou seja F/pM , no tratamento dos nossos dados. Assim, em resumo, os dados da CEP a serem analisados serão a força dinâmica (Fd), a força estática (Fs) e a tensão passiva relativizada (F/pM).

Para análise estatística dos dados obtidos, foi utilizada a ANOVA two-way, seguida do Teste de Comparações Múltiplas para verificação de diferenças dentro dos grupos, utilizando o software StatGraphics®.

4.3.3 Material e Métodos para Análise Histoquímica

Após excisados, os músculos foram imersos em isopentano a baixa temperatura, e depois congelados em nitrogênio líquido até serem examinados.

Com um criótomo, mantido a -20°C , foram obtidas secções transversas ($10\mu\text{m}$), e coradas em ATPase miofibrilar cálcio-ativada (mATPase), após pré-incubação em diferentes níveis de pH. As fibras musculares foram classificadas de acordo com a intensidade de reação à ATPase após a pré-incubação em meio alcalino (pH 10,3) ou

ácido (pH 4,3 e 4,6), nos três tipos principais, levando em consideração o percentual de fibras do tipo I em relação ao conjunto de fibras do tipo II (Pierobon-Bormioli et al, 1981) .

Após a preparação das lâminas, as imagens das células musculares foram registradas em computador utilizando o sistema de análise de Imagens QWin Leica[®]. A composição muscular por tipos de fibras foi determinada através da contagem de aproximadamente 1000 fibras por músculo, em campos regularmente distribuídos sobre a amostra. A área de secção transversal foi aferida, para comparação entre os grupos nutricionais da área de cada tipo de fibra.

Os dados desta análise são apresentados em média e desvio padrão, e analisados estatisticamente através do software Statgraphics[®]. Uma análise de variância two-way foi realizada para avaliar a influência da idade, do tipo de músculo e do estado nutricional. Em caso de diferença significativa, uma análise post hoc foi realizada através do teste de comparações múltiplas, assumindo um nível de 95% para admitir uma diferença estatística.

4.3.4 Análise dos Resultados

Peso Corporal e Muscular

O peso corporal dos animais N aos 90 dias de idade mostrou-se aproximadamente quatro vezes maior, quando comparados aos de 25 dias ($95,2 \pm 2,4$ g aos 25 dias e $460,1 \pm 14,6$ g aos 90 dias, $p < 0.05$). Neste mesmo grupo, esta evolução foi acompanhada por um aumento semelhante tanto no peso do músculo solear quanto no EDL (solear: $63,3 \pm$

1,5mg aos 25 dias, $232,1 \pm 7,1$ mg aos 90 dias, $p < 0,05$; EDL: $50,9 \pm 1,6$ mg aos 25 dias, $240,9 \pm 6,9$ mg aos 90 dias, $p < 0,05$) (figura 24).

No grupo D, a evolução foi semelhante, sendo os pesos corporais de $55,8 \pm 6,73$ g aos 25 dias e $363,5 \pm 28,59$ g aos 90 dias. ($p < 0,05$). O peso do músculo solear foi de $35,75 \pm 5,84$ mg aos 25 dias e $203,62 \pm 26,09$ mg aos 90 dias ($p < 0,05$). Para o EDL, o peso foi de $27,67 \pm 7,24$ mg aos 25 dias e $183,81 \pm 18,82$ mg aos 90 dias ($p < 0,05$) (figura 25).

De forma interessante, a evolução do peso em relação à idade mostrou-se diferente no solear e no EDL, quando o peso do músculo foi relativizado em relação ao peso corporal. Em ambos grupos nutricionais, o peso relativizado do solear diminuiu aos 90 dias, comparado aos 25 dias (N: $0,65 \pm 0,01$ mg/g aos 25 dias, $0,5 \pm 0,0$ mg/g aos 90 dias, $p < 0,05$). D: $0,65 \pm 0,02$ mg/g aos 25 dias, $0,54 / g \pm 0,0$ mg/g aos 90 dias, $p < 0,05$). No EDL, nenhuma diferença foi observada (N: $0,52 \pm 0,01$ mg/g aos 25 dias, $0,5 \pm 0,0$ mg/g aos 90 dias; D: $0,52 \pm 0,04$ mg/g aos 25 dias, $0,51 \pm 0,0$ mg/g aos 90 dias) (figura 26).

Se comparados os dois grupos nutricionais, o grupo D apresentou-se reduzido em relação ao N, em ambas idades, tanto para os pesos corporais quanto dos músculos ($p < 0,05$). Comparando o peso muscular relativizado com o peso corporal, observou-se diferença significativa apenas no solear aos 90 dias, que se mostrou aumentado no grupo D ($p < 0,05$) (figura 26).

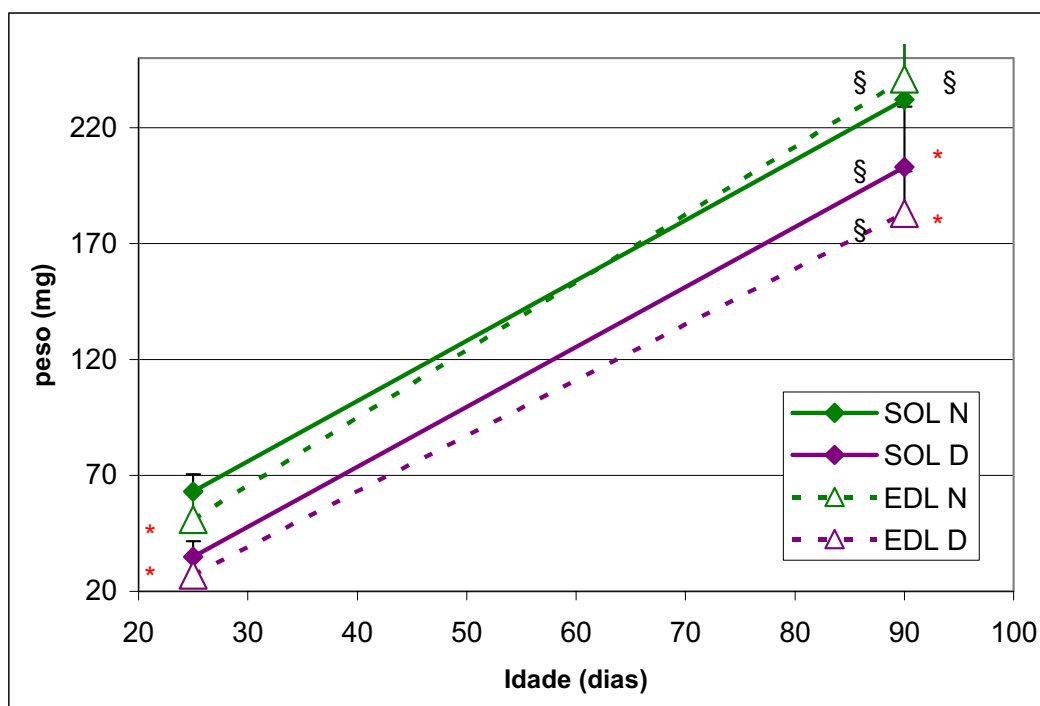


Figura 25: Evolução dos pesos musculares nos músculos solear e EDL em ratos aos 25 e 90 dias de idade, normo (N) ou desnutridos (D). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão; § indica diferença entre as idades de 25 e 90 dias. . *: indica diferença entre os grupos N e D, na mesma idade, com $p < 0,05$.

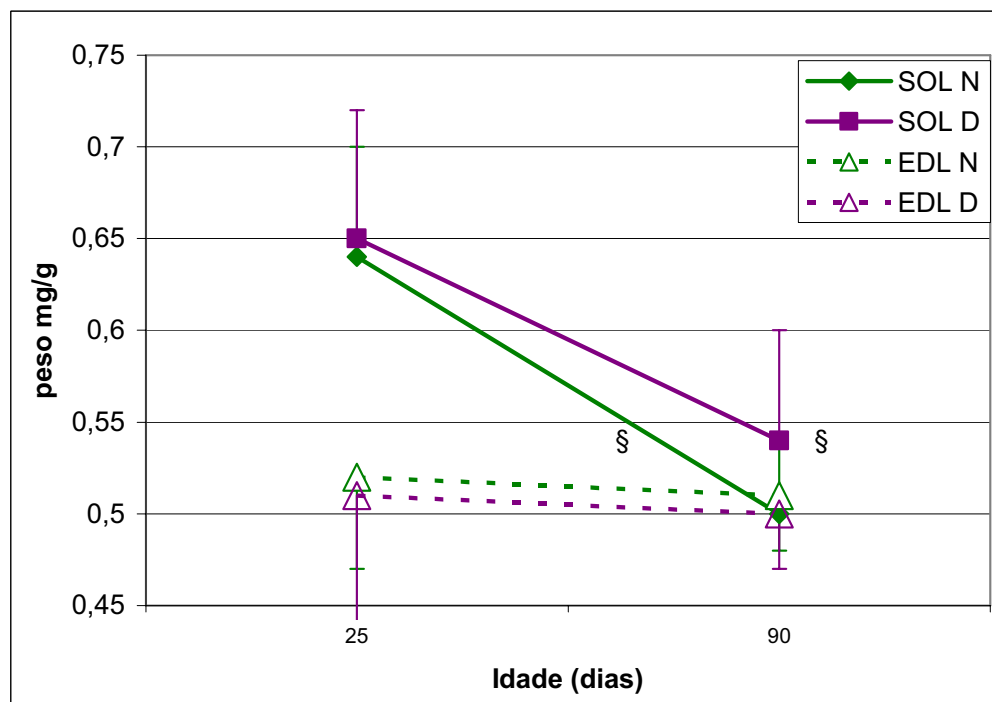


Figura 26: Evolução dos pesos musculares relativos nos músculos solear e EDL em ratos aos 25 e 90 dias de idade, normo (N) ou desnutridos (D). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão; § indica diferença entre as idades de 25 e 90 dias. . *: indica diferença entre os grupos N e D, na mesma idade, com $p < 0,05$.

Força e caracterização do Twitch

No grupo N, as tensões desenvolvidas durante o twitch e o tétano foram significativamente mais elevadas aos 90 dias em relação aos 25 dias, tanto para o músculo solear quanto para o EDL ($p < 0.05$, Tabela 2). Quando se relativizou a tensão tetânica em relação à massa muscular, entretanto, os resultados indicaram um aumento na tensão relativa do EDL. Comparando-se os músculos solear e EDL na mesma idade, observou-se um aumento na tensão absoluta do twitch e tétano no EDL, duas vezes maior que no solear. Em relação ao CT e HRT, ambos apresentaram um aumento com a idade no músculo solear, entretanto nenhuma diferença foi vista no EDL (Tabela 2).

No grupo D, as tensões absolutas no twitch e tétano foram maiores na idade de 90 dias, comparada aos 25 dias ($p < 0.05$). Ao se relativizar o peso muscular com relação ao peso corporal, entretanto, nenhuma diferença foi encontrada para o músculo solear nas duas idades. Os valores de CT e HRT mostraram-se aumentados aos 90 dias no solear ($p < 0.05$), mas não houve diferença no EDL (Tabela 2). Ao se comparar os dois músculos na mesma idade, os valores absolutos de força foram sempre superiores no músculo EDL se comparados ao solear, embora não tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa na idade de 25 dias. CT e HRT mostraram-se diminuídos no EDL, nas duas idades (Tabela 2).

Na comparação entre os dois grupos nutricionais, observou-se que o valor de tensão tetânica do solear foi menor ($p < 0,05$) no grupo D aos 25 dias. O twitch, apesar de mostrar valores 23% menores no grupo D nesta idade, não apresentou diferença estatisticamente significativa. Entretanto, ao se relativizar a tensão com o peso do músculo, no solear aos 25 dias não se encontra diferença no tétano, porém a tensão no twitch mostrou-se aumentada nos desnutridos ($p < 0,05$). Aos 90 dias, não houve

diferença entre N e D no solear. Para o EDL, tanto a tensão tetânica quanto no twitch mostraram-se diminuídas no grupo D em ambas idades. A tensão tetânica relativizada com o peso, entretanto, foi maior no EDL do grupo D aos 90 dias. CT e HRT foram mais prolongados nos desnutridos apenas para o músculo solear, aos 25 dias de idade (Tabela 2).

		Pt (mN)	P₀ (mN)	P₀/M (mN/mg)	CT (ms)	HRT (ms)
Solear	N, 25 dias	81,9 ± 4 (24)	363 ± 17 (24)	5,76 ± 0,3 (24)	56,5 ± 0,9 (24)	72,9 ± 3,6 (24)
	N, 90 dias	228 ± 11 (21) §	1.441 ± 46 (21) §	6,27 ± 0,22 (21)	73,4 ± 1,6 (21) §	115,4 ± 3 (21) §
	D, 25 dias	67,9 ± 5,4 (12)	245,5 ± 20,8 (12) *	6,79 ± 0,37 (12)	64,4 ± 1,67 (12) *	88,9 ± 3,2 (12) *
	D, 90 dias	239,2 ± 18 (13) §	1.369 ± 60 (14) §	6,73 ± 0,22 (14)	73,2 ± 2,88 (13) §	118,1 ± 5,5 (13) §
EDL	N, 25 dias	170 ± 13 (22) #	516 ± 34 (22)	10,01 ± 0,51 (22) #	23,3 ± 0,5 (22) #	25,5 ± 0,6 (22) #
	N, 90 dias	909 ± 40 (17) § #	2.744 ± 143 (20) § #	11,47 ± 0,49 (20) § #	25,0 ± 0,4 (17) #	25,8 ± 0,4 (17) #
	D, 25 dias	87,2 ± 16 (7) *	304,5 ± 44,7 (7) *	10,87 ± 1,19 (7)	22,8 ± 0,8 (7)	25,9 ± 1,06 (7)
	D, 90 dias	727,7 ± 28,9 (12) § # *	2.419 ± 128,3 (12) § # *	13,24 ± 0,7 (12) § # *	26,4 ± 1,5 (12) #	25,8 ± 0,8 (12) #

Tabela 2 - Tensão do Twitch (Pt) e do tétano (P₀), tensão relativa no tétano (P₀/M), tempo de contração (CT) e tempo de meio-relaxamento (HRT) nos músculos solear e EDL em ratos aos 25 e 90 dias de idade, normo (N) ou desnutridos (D). Valores expressos em média ± erro padrão (número de sujeitos entre parênteses). §: indica efeito significativo da idade para o mesmo músculo e grupo nutricional, com p<0,05. #: indica diferença significativa entre solear e EDL, na mesma idade e mesmo grupo nutricional, com p<0,05. *: indica diferença entre os grupos N e D, na mesma idade, com p<0,05.

Caracterização da Fadiga

Para o grupo N, conforme a Tabela 3, no músculo EDL não se observam diferenças no Índice de Resistência à Fadiga entre as idades 25 e 90 dias. Entretanto, para o solear, a resistência à fadiga mostrou-se aumentada aos 90 dias, aos 60, 90 e 120 seg após o início do teste. Ao se comparar os músculos solear e EDL no grupo N, observa-se que o EDL se mostrou globalmente mais fatigável, com diferenças observáveis a partir do primeiro minuto (Tabela 3).

No grupo D, não foi encontrada nenhuma alteração na resistência à fadiga no músculo solear com relação à idade. No EDL à idade de 90 dias, por sua vez, verificou-se um aumento na resistência no 30ºs, seguido de uma redução deste índice de resistência no 90º e 120º segundos (Tabela 3).

Ao comparar os grupos N e D, verifica-se um aumento na resistência à fadiga dos desnutridos aos 25 dias, apenas para o músculo solear. Não houve diferenças significativas nas outras comparações.

		Índice de Resistência 30 s	Índice de Resistência 60 s	Índice de Resistência 90 s	Índice de Resistência 120 s s
Solear	N, 25 dias (12)	82.6 ± 2.9	74.7 ± 3.1	69.4 ± 3.3	64.1 ± 3.1
	N, 90 dias (7)	90.5 ± 3.9	86.6 ± 4.1 §	82.2 ± 4.4 §	77.1 ± 4.1 §
	D, 25 dias (10)	89,8 ± 1,4 *	83,5 ± 1,2 *	79,3 ± 1,0 *	75,5 ± 1,7 *
	D, 90 dias (5)	90,7 ± 2,5	84,4 ± 2,9	79,6 ± 3,3	73,2 ± 4,7
EDL	N, 25 dias (9)	77.1 ± 3.4	62.3 ± 3.6 #	37.4 ± 3.9 #	21.2 ± 3.6 #
	N, 90 dias (6)	81.2 ± 4.2	58.3 ± 4.4 #	29.0 ± 4.7 #	16.7 ± 4.4 #
	D, 25 dias (8)	73,5 ± 1,4 #	54,4 ± 3,6 #	34,3 ± 3,3 #	21,2 ± 3,3 #
	D, 90 dias (5)	90,2 ± 2,4 §	59,4 ± 1,6 #	21,5 ± 1,2 § #	8,35 ± 0,5 § #

Tabela 3: índice de resistência à fadiga aos 30, 60, 90 e 120 seg de teste, em músculos solear e EDL de ratos Normo (N) ou Desnutridos (D), nas idades de 25 e 90 dias. Valores expressos em média ± DP (número de observações entre parênteses). §: indica efeito significativo da idade para o mesmo músculo e grupo nutricional, com $p < 0,05$. #: indica diferença significativa entre solear e EDL, na mesma idade e mesmo grupo nutricional, com $p < 0,05$. *: indica diferença entre os grupos N e D, na mesma idade, com $p < 0,05$.

Velocidade Máxima de Encurtamento (Vmax)

No grupo controle N, a Vmax diminuiu com a idade, em ambos os músculos estudados, na ordem de 20% no solear e 22% no EDL. Se comparados os diferentes músculos, observa-se um aumento significativo na Vmax do EDL em relação ao solear, sendo esse aumento na razão de 2,5 vezes, nas duas idades avaliadas (Figura 27).

No grupo D, a Vmax também apresentou aumento com a evolução da idade, tanto no solear quanto no EDL. Comparado ao solear no mesmo grupo nutricional e etário, o EDL mostrou maiores valores de Vmax que o solear (Figura 27).

O grupo D, comparado ao N, apresentou aumento na Vmax aos 25 dias tanto no músculo solear quanto no EDL. Aos 90 dias, porém, nenhuma diferença foi observada entre N e D (Figura 27).

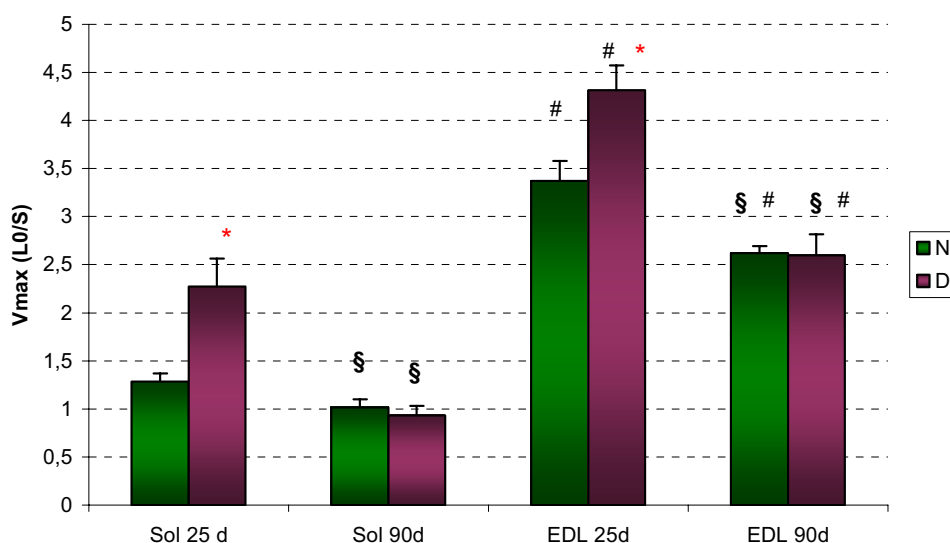


Figura 27 : Velocidade Máxima de Encurtamento (Vmax) obtida em músculos solear e EDL de rato, aos 25 e 90 dias de idade, em animais Normo (N) ou Desnutridos (D) (número de observações entre parênteses). §: indica efeito significativo da idade para o mesmo músculo e grupo nutricional, com $p < 0,05$. #: indica diferença significativa entre solear e EDL, na mesma idade e mesmo grupo nutricional, com $p < 0,05$. *: indica diferença entre os grupos N e D, na mesma idade, com $p < 0,05$.

Propriedades do Componente Elástico em Série

Como se pode observar na figura 27, as curvas de tensão-extensão estabelecidas tanto para o músculo solear quanto para o EDL apresentam uma forma não linear, demonstrando uma redução na força produzida (P/P_0) quando o comprimento imposto ao músculo diminui ($\Delta L/L_0$) (Figura 28).

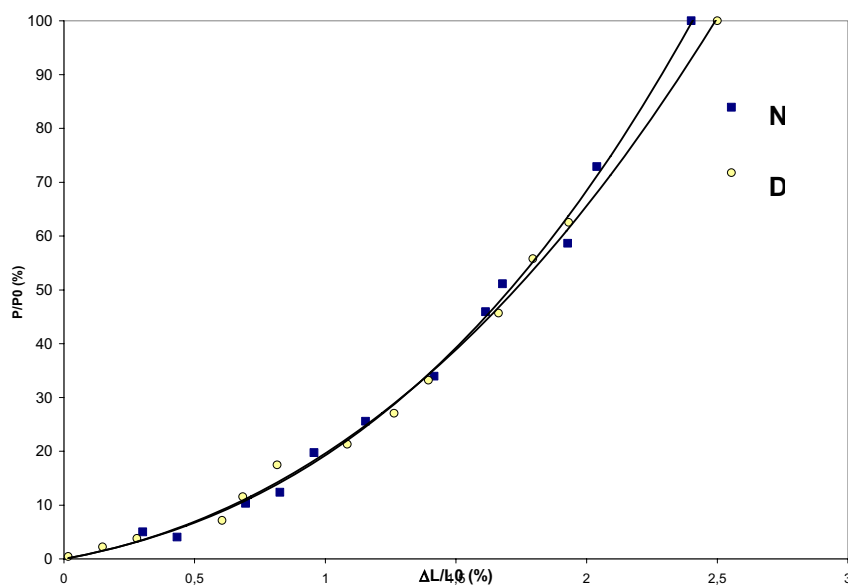


Figura 28 - Curvas típicas da relação Tensão-Extensão, obtidas em músculos solear de rato à idade de 25 dias, normais (N) ou desnutridos (D)

No grupo N, tanto o solear quanto o EDL mostraram-se mais resistentes à extensão aos 90 dias que aos 25 dias (Tabela 4). Este aumento na resistência à extensão do CES devido ao crescimento foi confirmado pelo cálculo da extensibilidade relativizada no nível $0,2 P_0$, assim como pelo fato de que a extensão máxima (D_{max}) também se apresentou menor aos 90 dias do que aos 25 dias, nos dois músculos. A redução na área sob a curva no solear de 90 dias também confirma o citado aumento da resistência à extensão dos elementos elásticos em série em relação à idade de 25 dias. Comparando os músculos solear e EDL, este último se apresentou sempre com maior extensibilidade, nas duas idades avaliadas (Tabela 4).

No grupo D a idade influenciou de forma semelhante o CEP. Observou-se um aumento da resistência à extensão aos 90 dias de idade, tanto do solear quanto do EDL, conforme demonstrado pela redução na extensibilidade ao nível de $0,2P_0$. A D_{max} mostrou-se igualmente diminuída aos 90 dias, em ambos os músculos. Não se observou

diferença na Dmax. A comparação entre o solear e o EDL no grupo D demonstra que, como no grupo N, o EDL também apresenta maior extensibilidade que o solear, nas duas idades avaliadas (Tabela 4).

A comparação entre N e D, o único parâmetro que apresentou diferença significativa foi a Dmax, que se mostrou aumentada tanto aos 25 quanto aos 90 dias no músculo solear do grupo D. EDL não sofreu alterações relacionadas à desnutrição.

		Extensibili- dade em P_0 $(L_0/P_0).10^2$	Extensibili- dade em $0.2P_0$ $(L_0/P_0).10^2$	Área $(\Delta L/L_0).(P/P_0).10^4$	Extensão Máxima (Dmax) $(\% L_0).10^2$
Solear	N, 25 dias (12)	$1,3 \pm 0,03$	$2,6 \pm 0,1$	83 ± 2	$2,22 \pm 0,06$
	N, 90 dias (12)	$1,15 \pm 0,03$	$2,1 \pm 0,05$ §	69 ± 2 §	$1,78 \pm 0,05$ §
	D, 25 dias (6)	$1,3 \pm 0,07$	$2,8 \pm 0,2$	85 ± 2	$2,6 \pm 0,24$ *
	D, 90 dias (7)	$1,18 \pm 0,05$ #	$2,3 \pm 0,1$ § #	74 ± 2 #	$2,15 \pm 0,08$ § # *
EDL	N, 25 dias (10)	$1,60 \pm 0,09$ #	$3,24 \pm 0,13$ #	101 ± 4 #	$2,83 \pm 0,11$ #
	N, 90 dias (11)	$1,75 \pm 0,07$ #	$2,62 \pm 0,20$ § #	92 ± 7 #	$2,40 \pm 0,09$ § #
	D, 25 dias (5)	$1,65 \pm 0,2$	$3,54 \pm 0,07$	105 ± 5	$2,98 \pm 0,09$
	D, 90 dias (5)	$1,84 \pm 0,09$ #	$2,86 \pm 0,14$ § #	100 ± 4 #	$2,51 \pm 0,01$ § #

Tabela 4 : Propriedades de tensão/extensão dos músculos solear e EDL de rato, aos 25 e 90 dias de idade, em animais Normo (N) ou Desnutridos (D). Valores expressos em média $\pm$ DP (número de observações entre parênteses). §: indica efeito significativo da idade para o mesmo músculo e grupo nutricional, com $p < 0,05$. #: indica diferença significativa entre solear e EDL, na mesma idade e mesmo grupo nutricional, com $p < 0,05$. *: indica diferença entre os grupos N e D, na mesma idade, com $p < 0,05$.

Propriedades do Componente Elástico em Paralelo

No grupo N, os valores de força Força no teste de relaxamento apresentam-se estabilizados entre as idades de 25 e 90 dias, com exceção da Fd no solear, que

diminuiu (Tabela 5). No teste de estiramento em rampa, a força se mantém no solear aos 90 dias, porém diminui no EDL nesta idade (tabela 6). A tensão relativizada diminui com a idade em ambos os músculos, nos dois testes realizados (tabelas 5 e 6).

O grupo D apresentou um comportamento diferente na produção de força com relação à evolução da idade: ambos os músculos apresentaram redução da Fd e Fs (tabelas 5 e 6). A tensão relativizada pelo peso muscular diminuiu igualmente. As diferenças verificadas entre solear e EDL são coerentes com o perfil de cada músculo, onde o EDL desenvolve sempre uma força mais elevada se comparado ao solear na mesma idade (tabelas 5 e 6).

A desnutrição induziu globalmente a um aumento na Fd e Fs na idade de 25 dias em ambos os músculos, com aumento também na tensão relativizada (tabelas 5 e 6).

		Força/ Valores Absolutos		Tensão/ Val. Relativizados	
		Fd (mN)	Fs (mN)	Fd/pM (N/g)	Fs/pM (N/g)
Solear	N, 25 dias (8)	147±38	87 ±19	2,57 ± 0,85	1,05 ±0,41
	N, 90 dias (8)	141±31	51±15 §	0,58 ± 0,18 §	0,21 ± 0,07 §
	D, 25 dias (4)	260±52 *	92±17 *	5,92 ± 1,03 *	2,08 ± 0,35 *
	D, 90 dias (6)	132±25 §	43±9 §	0,71 ± 0,16 §	0,23 ± 0,06 §
EDL	N, 25 dias (8)	569±104 #	251±51 #	13,14 ± 2,35 #	5,83 ± 1,20 #
	N, 90 dias (9)	588±54 #	169±21 #	2,33 ± 0,40 § #	0,67 ± 0,14 §
	D, 25 dias (4)	756±107 # *	338±57 #	25,27 ± 4,14 # *	11,29 ± 2,11 # *
	D, 90 dias (8)	606±142 § #	163±49 § #	3,38 ± 0,64 § #	0,67 ± 0,91 §

Tabela 5 - Teste de Relaxamento: valores absolutos e relativizados em relação ao peso muscular (F/M) de tensão passiva em resposta a um estiramento rápido de 14% a partir do L₀, desenvolvida pelos músculos solear e EDL de rato, aos 25 e 90 dias de idade, em animais Normo (N) ou Desnutridos (D). Valores expressos em média ± EP (número de observações entre parênteses). §: indica efeito significativo da idade para o mesmo músculo e grupo nutricional, com p<0,05. #: indica diferença significativa entre solear e EDL, na mesma idade e mesmo grupo nutricional, com p<0,05. *: indica diferença entre os grupos N e D, na mesma idade, com p<0,05.

		F (mN)	F/pM (N/g)
Solear	N, 25 dias (15)	70 ± 20	1,18 ± 0,43
	N, 90 dias (8)	70 ± 20	0,28 ± 0,08 §
	D, 25 dias (4)	120 ± 30	2,79 ± 1,06 *
	D, 90 dias (7)	70 ± 20	0,35 ± 0,10
EDL	N, 25 dias (12)	250 ± 90 #	5,65 ± 2,14 #
	N, 90 dias (9)	200 ± 50 § #	0,84 ± 0,29 §
	D, 25 dias (4)	420 ± 40 # *	12,94 ± 1,25 # *
	D, 90 dias (8)	180 ± 60 #	1,04 ± 0,31 §

Tabela 6 - Teste de Estiramento em Rampa (estiramento quase-estático): força desenvolvida a 14% do estiramento imposto, em valores absolutos (F) e relativizados (F/pM) em relação ao peso dos músculos solear e EDL de rato, aos 25 e 90 dias de idade, em animais Normo (N) ou Desnutridos (D). Valores expressos em média ± DP (número de observações entre parênteses). §: indica efeito significativo da idade para o mesmo músculo e grupo nutricional, com $p < 0,05$. #: indica diferença significativa entre solear e EDL, na mesma idade e mesmo grupo nutricional, com $p < 0,05$. *: indica diferença entre os grupos N e D, na mesma idade, com $p < 0,05$.

Análise Histológica

Para evitar erros de interpretação quanto à intensidade de coloração das fibras Ila e I Ib, tanto a proporção quanto a área de secção transversa foram agrupadas para fins de análise.

A proporção de fibras tipo I aumenta com a idade no músculo solear (59% aos 25 dias e 90% aos 90 dias, $p < 0,05$), e diminui no EDL (5,7% e 3,6%, respectivamente, $p < 0,05$). Nos desnutridos, a proporção de fibras evoluiu de forma semelhante (solear 25 dias: 60%, 90dias: 89,5%; EDL 25 dias: 5,8%, 90 dias: 3,8%, $p < 0,05$)., sem diferença entre os grupos N e D.

As fibras de tipo II apresentaram a seguinte evolução com a idade: diminuíram no solear (40,7% aos 25 dias e 9,6% aos 90 dias, $p < 0,05$), e aumentaram no EDL (94,3% aos 25 dias e 96,4% aos 90 dias, ns). Nos desnutridos, a proporção de fibras tipo II evoluiu de forma semelhante: diminuiu no solear (25 dias: 39,5%, 90dias: 10,45%,

$P < 0,05$) E aumentou no EDL (25 dias: 94,2%, 90 dias: 96,2%, $p < 0,05$), sem diferença entre os grupos N e D.

A área de secção transversa das fibras do tipo I aumentou significativamente com a idade, para os músculos solear e EDL nos grupos N e D ($p < 0,05$).

Comparando a área de secção transversa das fibras do tipo I entre N e D, observou-se uma redução em D no solear, tanto aos 25 quanto aos 90 dias de idade (N: $1124\mu\text{m}^2$ x D: $525\mu\text{m}^2$, aos 90 dias, N: $3600\mu\text{m}^2$, D: $2210\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). No EDL, também houve redução da área no grupo D, mas sem diferença aos 25 dias (N: $321\mu\text{m}^2$, D: $230\mu\text{m}^2$ aos 25 dias, ns; aos 90 dias, N: $1205\mu\text{m}^2$, D: $981\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$).

4.3.5 Discussão

O período entre a idade do desmame e a idade adulta é marcado por grandes mudanças, tanto no crescimento quanto na maturação de funções fisiológicas. O crescimento corporal e muscular seguem um trajeto contínuo, embora com ritmos diferentes. Podem ser observados diferentes ritmos de crescimento entre diferentes músculos, como podemos verificar entre o solear e EDL no presente trabalho: na relação peso muscular/peso corporal observa-se uma diminuição no solear aos 90 dias, mas não se encontram diferenças no EDL quando comparadas as diferentes idades. As diferentes funções dos músculos solear e EDL podem justificar essa diferença no ritmo de crescimento: enquanto o solear desempenha uma função predominantemente postural, o EDL se relaciona a deslocamentos em marcha; portanto, o solear é um músculo constantemente ativado durante todo o período de vigília desde o início da

capacidade de sustentação do animal já nas primeiras semanas pós-natais (Brocard et al, 1999), enquanto que o EDL passa a ser recrutado com maior intensidade após a aquisição da marcha, o que ocorre aproximadamente da metade ao final do período de aleitamento (Gramsbergen, 1998).

Os animais desnutridos apresentam diminuição dos pesos corporal e muscular aos 25 dias de idade e, apesar de demonstrarem uma certa recuperação do peso corporal e muscular aos 90 dias, permanecem com ambos os parâmetros diminuídos com relação aos animais normonutridos. Este resultado já foi relatado em estudos anteriores (Lago et al, 1997; Barros et al, 2006) e demonstra o quanto a desnutrição durante períodos críticos do desenvolvimento pode ter consequências duradouras. Observa-se que a desnutrição não influenciou o ganho de peso do músculo solear entre 25 e 90 dias, chegando a determinar um aumento significativo da relação peso muscular/peso corporal nos animais desnutridos na idade de 90 dias, comparados aos normonutridos. Este fenômeno não foi observado no EDL, o qual se conserva sempre abaixo da linha de evolução dos músculos normonutridos. Achados semelhantes foram descritos por Layman et al (1981) e Bedi et al (1982). Dwyer e Stickland (1992) sugerem ser a aparente preservação do solear devida à predominância de miotubos primários como origem das fibras tipo I -predominantes neste tipo de músculo-, mais antigas ontogeneticamente e, portanto, mais preservadas de influências ambientais que as fibras secundárias. Diversos estudos demonstram que a desnutrição precoce leva a diminuição do peso muscular em mamíferos como ovelhas (Greenhold et al, 2000), porcos (Lefaucheur et al, 2003) e ratos (Wilson et al, 1988; Yamaguchi et al, 1993; Silvado e Werneck, 2006). Estes efeitos parecem persistir por períodos prolongados, e quando a desnutrição é imposta durante a fase pré-natal ou de aleitamento, a recuperação é mais difícil do que quando ocorre após o desmame (Bedi et al, 1982; Pond et al, 1990).

Mesmo em humanos, existem evidências de que o baixo peso ao nascer está relacionado a redução na massa muscular na idade adulta (Hediger et al, 1998).

Se a desnutrição é imposta no período pós-natal, como foi realizado no presente trabalho, os efeitos são menos pronunciados quanto ao número e proporção de fibras musculares, mas o peso corporal e muscular são afetados (Layman et al, 1981; Yamaguchi et al, 1996; Silvado e Werneck, 2006). Nesse sentido de influência negativa da desnutrição sobre o crescimento, existem relatos sobre redução na síntese protéica de miofibrilas e retículo sarcoplasmático, com retardo no crescimento por indisponibilidade de substrato (Glore e Layman, 1983; Fiorotto et al, 2000). O crescimento longitudinal de fibras não parece ser afetado pela desnutrição, mas a redução na área de secção transversa é evidente (Silvado e Werneck, 2006).

Nossa análise histológica revelou que a desnutrição induzida no período neonatal reduziu a área de secção transversal das fibras musculares, mas não demonstrou modificações na tipologia de fibras. Entretanto, a coloração através da reação ATPase miofibrilar, metodologia empregada no presente trabalho, é um método passível de falhas, principalmente quando os músculos a serem avaliados podem potencialmente apresentar alterações metabólicas. Ligeiras modificações na acidez do meio podem alterar as reações e dificultar a identificação de subtipos de formas rápidas, mais ainda de tipos indiferenciados (White et al, 2000; Silvado e Werneck, 2006). É interessante o uso de técnicas mais precisas, como a imunohistoquímica, para determinar com maior acurácia os efeitos da desnutrição sobre as fibras de contração rápida.

O aumento da força muscular com a evolução da idade, conforme observado neste trabalho e referido na literatura era previsível, devido ao crescimento do músculo, (Close, 1972; Lodder et al, 1993). Entretanto, enquanto a tensão tetânica relativizada quanto ao peso muscular (P_0/M) não apresentou modificações no solear, o EDL de 90 dias desenvolveu maior P_0/M que aos 25 dias. O desenvolvimento da força muscular depende do material contrátil disposto em paralelo no músculo, sendo a força geralmente relativizada com relação à área de secção transversa fisiológica (ASTF), uma vez que esta área e a força máxima são proporcionais (Powell et al, 1984). A ASTF, que representa uma área transversal do músculo perpendicular ao eixo das fibras, é calculada seguindo a equação $pM/(L_0 \cdot L_f/L_0 \cdot 1,06)$, onde L_f/L_0 é a proporção entre o comprimento da fibra e o comprimento do músculo, e 1,06 é a densidade do músculo esquelético (Segal e Faulkner, 1985). Entretanto, entre 25 e 90 dias de idade o músculo é submetido a importantes aumentos tanto no peso quanto na sua comprimento e a modificações na sua arquitetura, levando a alterações na relação L_f/L_0 . No EDL foi registrada uma redução de 18% nesta relação entre 40 e 120 dias de idade, sendo que na idade adulta ele apresenta um ângulo de penação de 10° (Huijing et al, 1994). Assim, para este músculo penado, um menor aumento no L_f em comparação com o L_0 pode levar a um aumento no ângulo de penação devido à idade, e isto poderia explicar o aumento na tensão tetânica relativa no EDL. No caso do solear, que tem um arranjo quase paralelo de suas fibras, contribuições de alterações relacionadas à arquitetura muscular podem ser consideradas desprezíveis (Close, 1964).

Em todas as idades avaliadas, o músculo solear apresentou uma menor força tetânica que o EDL, sendo essa diferença entre músculos lentos e rápidos referida na literatura (Close, 1972). A força desenvolvida por unidade de área de secção transversa é menor em fibras lentas do que em rápidas (Bottinelli et al, 1994), e as diferenças entre

solear e EDL podem ser relacionadas ao tipo de fibra predominantes nestes músculos, mesmo se outros fatores como a arquitetura muscular possam interferir na produção da força (Close, 1972). Entretanto, este aumento de força pode igualmente estar relacionado com o padrão de atividade locomotora que o animal desenvolve ao final do período de lactação, e que envolve um maior recrutamento de sua atividade (Jamon e Clarac, 1998; Bewick et al, 2004).

Embora as forças absolutas tenham aumentado com a idade em ambos músculos e grupos nutricionais, a desnutrição causou redução no peso e, conseqüentemente, redução na força desenvolvida em ambos os músculos estudados aos 25 dias. A ausência de significância estatística para a redução observada de 17% na força durante o twitch no solear desnutrido pode ser justificada pelo grande desvio padrão encontrado no presente estudo. É interessante ressaltar que a tendência do músculo solear nos desnutridos em seguir o ritmo de crescimento do grupo normal pode ter influenciado positivamente a recuperação na produção de força à idade adulta, onde não se observam diferenças entre os dois grupos nutricionais.

A diminuição da força absoluta aconteceu de forma mais marcante no EDL, onde mesmo após um longo período de recuperação nutricional, aos 90 dias de idade, uma redução significativa nos valores absolutos de força ainda era observada. Uma maior sensibilidade de fibras rápidas a privações nutricionais já foi relatada, o que poderia justificar as alterações aqui encontradas no EDL, um músculo onde predomina este tipo de fibra (Lefaucheur et al, 2003).

A força tetânica relativizada em relação ao peso muscular não foi alterada pela desnutrição, a não ser no EDL aos 90 dias de idade, no qual a força nos desnutridos apresentou-se aumentada. Isto faz pensar numa estimulação funcional pelo aumento na atividade locomotora com a idade (Walton et al, 1992; Bewick et al, 2004). Uma

quantidade maior de material contrátil em relação ao peso do músculo EDL nos desnutridos poderia ser hipotetizada.

A variação nos aspectos da cinética de contração muscular, CT e HRT, no que diz respeito à evolução da idade aqui encontrados, estão de acordo com a literatura (Close, 1972, Hennig e Lomo, 1987; Gundersen e Eken, 1992) onde ocorre uma prolongação na cinética de contração em músculos lentos, que acompanha o processo de diferenciação de fibras, com aumento na proporção do tipo I. No EDL, a não variação com a idade também se relaciona à diferenciação de fibras, cujo perfil na proporção entre lentas e rápidas na idade do desmame se assemelha ao encontrado na idade adulta (Punkt et al, 2004). CT e HRT são parâmetros que variam de acordo com o tipo de fibras predominantes no músculo, a cinética do Ca^{++} e com o CES (Close, 1972; Clausen, 1991; Hill, 1938; Stevens e Renaud, 1985); as modificações que este componente sofre com a evolução da idade podem modificar os parâmetros do twitch: uma vez que existe um aumento da resistência no CES induzido pelo crescimento no solear, o twitch também se torna mais prolongado neste músculo.

A desnutrição influenciou CT e HRT apenas no solear aos 25 dias, onde foi observada uma lentificação destes parâmetros em relação aos normonutridos. No EDL este prolongamento não foi verificado. Vale salientar que a elevada velocidade de contração neste músculo, somada ao curto intervalo de tempo de aquisição de dados na avaliação do twitch, dificulta a observação de alterações mais sutis que possam ter ocorrido.

No nosso estudo, não foram encontradas diferenças nas proporções de fibras nem no CES entre normo e desnutridos. Sabendo-se que a aquisição de habilidades contráteis é também alcançada a partir da maturação dos sistemas implicados no

movimento de Ca^{++} (Clausen, 1991), a lentificação encontrada nos desnutridos pode ser resultado de alterações na disponibilidade de Ca^{++} , ou ainda a modificações estruturais que levem a um funcionamento inadequado das bombas iônicas. Em estudos onde os níveis de função tireoideana foram alterados para simular uma situação de desnutrição severa, foi sugerido que o número de bombas iônicas estaria reduzido, assim como a captação de Ca^{++} (Harrison et al, 1996). A ausência de alterações em CT e HRT observada nos animais de 90 dias sugere uma recuperação funcional após o período de recuperação nutricional.

A resistência à fadiga foi mais pronunciada no solear adulto, em comparação com a idade do desmame, mas nenhuma diferença foi observada no EDL. Além disto, nas duas idades avaliadas, o solear apresentou sempre uma maior resistência à fadiga que o EDL. Estas diferenças na fatigabilidade estão de acordo com o perfil histoquímico destes músculos. De fato, é largamente aceito que fibras do tipo I têm maior resistência à fadiga que as fibras tipo IIa, sendo este último menos fatigável que o tipo IIB (Burke et al, 1973). No nosso estudo, verificou-se um grande aumento de fibras tipo I no solear, o que explica o aumento de 20% no índice de resistência à fadiga entre a idade do desmame e a idade adulta.

Foi observado um aumento da resistência à fadiga no solear de animais desnutridos aos 25 dias. Estes resultados não estão de acordo com os relatados por Bissonette et al (1997) e Lefaucheur et al (2003). Entretanto, esse aumento na resistência à fadiga é também relatado por outros autores que relatam condições de privação nutricional precoce (Brozanski et al, 1993; Wank et al, 2000). De fato, Bronzanski e cols relatam que a resistencia à fadiga é maior nos primeiros dias pos-natais: no seu estudo em diafragma, com desnutrição pré e pós-natal associada, os

valores de resistência à fadiga foram semelhantes em animais controles e desnutridos na primeira semana pós-natal, mas os desnutridos apresentaram maior resistência à fadiga a partir da segunda semana de vida. Uma preservação da capacidade oxidativa em animais desnutridos foi relatada por Lefaucheur (2003), e ainda há autores que descrevem um aumento nessa capacidade oxidativa (White et al, 2000), o que poderia justificar os nossos achados.

A análise da velocidade máxima de encurtamento- V_{max} - mostra uma diminuição deste parâmetro durante o crescimento, tanto no músculo solear quanto no EDL. A V_{max} varia de acordo com o tipo de miosina, mas também em função do ângulo de penação e do número de sarcômeros que atuam em série no músculo. Uma vez que no músculo em crescimento existe um importante aumento no comprimento longitudinal –devido em parte ao aumento no comprimento das fibras e também ao número de sarcômeros em série – é interessante estimar a velocidade de encurtamento em termos de unidades de material contrátil funcionando em série. Usando este raciocínio, Close (1964) demonstrou uma redução da V_{max} por sarcômero no solear e EDL devido ao crescimento. Para isto, o cálculo de V_{max} para uma unidade de sarcômero foi realizado a partir do número de sarcômeros relatado por Close nos músculos solear e EDL. Para o solear, o cálculo revelou uma redução na V_{max} durante o crescimento ($0,008 \pm 0,0005$ mm/s aos 25 dias, $0,0064 \pm 0,0005$ mm/s aos 90 dias, $p < 0,05$), enquanto que para o EDL essa diminuição não é observada, o que se mostra de acordo com a ausência de modificações na tipologia de fibras. Finalmente, é importante notar que se o músculo esquelético apresenta uma proporção relativamente pequena na relação comprimento de fibra/comprimento do músculo (entre 0,34 e 0,41) (Lodder et al, 1994), a expressão de V_{max} em L_0/s se mostra inapropriada para representar as

alterações pareadas em velocidade máxima e perfil de fibras, quando o músculo é submetido a importantes modificações no seu comprimento, como ocorre durante o crescimento.

A Vmax mostrou-se aumentada nos animais desnutridos, aos 25 dias. Conforme descrito no parágrafo anterior, a ausência de modificações na tipologia de fibras dos animais desnutridos não está de acordo com esta alteração: um aumento da Vmax estaria mais associado a um perfil funcional com predominância de fibras rápidas. Uma hipótese que pode ser levantada para justificar o aumento da Vmax nos animais desnutridos é o atraso na diferenciação de isoformas embrionárias de cadeias pesadas de miosina. Segundo Whalen (1979), o período de transição de formas embrionárias para formas adultas de miosina se estende durante as primeiras semanas de vida pós-natal em animais altriciais, como o rato. Em seu estudo, que concorda com o trabalho de Agbulut (2003), na primeira semana de vida praticamente não se encontravam formas adultas de miosina, as quais se apresentavam gradativamente num aumento proporcional gradual em detrimento das isoformas embrionárias, que não apresentavam progressão durante a vida pós-natal. Alguns estudos demonstram que a desnutrição pós-natal pode influenciar a diferenciação de isoformas embrionárias, seja por aumento na expressão do tipo I (White et al, 2000), seja por persistência na expressão de formas embrionárias e/ou indiferenciadas (Lefaucheur et al, 2003). A redução na taxa de transformação de isoformas embrionárias e neonatais e sua substituição por formas adultas é também associada a condições de desnutrição e redução nos níveis do hormônio T₃, que tem função reguladora sobre esta transição de formas embrionária em adultas (Johnson et al, 1991; Fiorotto et al, 2000). Isto foi igualmente demonstrado para o músculo diafragma (Brozanski et al, 1991). Vale ressaltar que alterações nos níveis de hormônios

tireoideanos estão presentes em estados de desnutrição (Harrison et al, 1996). Nesse sentido, pode-se hipotetizar que os músculos avaliados no presente estudo poderiam estar ainda funcionalmente imaturos, se um atraso na transição de fibras tiver ocorrido durante a desnutrição. Eventuais modificações de cadeias leves de miosina ligadas à desnutrição precoce podem também influenciar a V_{max} . Nesse sentido, Bottinelli e cols (1994) demonstraram que a proporção relativa de duas destas cadeias, MLC3f / MLC2f influenciam a velocidade de encurtamento das fibras de contração rápida. A recuperação dos valores de V_{max} na idade adulta, quando se assemelhou aos normonutridos, ilustra uma provável maturação funcional.

O Componente Elástico em Série (CES) sofreu modificações com a idade, no sentido de uma redução na sua extensibilidade, em ambos os grupos e estados nutricionais. Estas modificações poderiam ser atribuídas à parte ativa deste componente (pontes cruzadas) ou à parte passiva (tendões). Em relação à parte ativa, estudos utilizando técnicas de hipo ou hiperatividade indicaram que um aumento na porcentagem de fibras de contração rápida no músculo solear estava relacionado a um aumento da extensibilidade do CES, assim como alterações mecânicas deste componente num sentido oposto estariam associadas a um aumento relativo na proporção de fibras de contração lenta (Goubel e Marini, 1987; Pousson et al, 1991; Canon e Goubel, 1995). Estes estudos sugeriram que fibras de contração lenta e rápida também apresentavam diferenças em suas propriedades elásticas. Assim, a redução na extensibilidade induzida pelo crescimento no músculo solear pode ser explicada em parte pela transição de fibras de contração rápida para lentas, observada neste músculo, mas também pode ser devida a um aumento na resistência de estruturas da parte passiva do SEC. Neste particular, mesmo que tenha sido dada bastante atenção no sentido de

minimizar o comprimento do tendão livre durante a excisão do músculo, o comprimento total do solear é ocupado em cerca de $\frac{1}{3}$ por tecido tendinoso intramuscular. A concentração de colágeno no solear, incluindo tendão, duplica entre a idade do desmame e a idade adulta (Alnaqeeb et al, 1984). Assim, pode-se esperar um aumento da resistência passiva do CES durante o crescimento, com diminuição da extensibilidade. Para o músculo EDL, entretanto, esta alteração não pode ser explicada pela modificação na parte ativa, pois modificações tipológicas não foram encontradas. Consequentemente, a redução da extensibilidade observada no EDL é provavelmente devida a adaptações da estrutura passiva do CES. Resultados de outros estudos que demonstram um aumento da concentração do colágeno no EDL consolidam esta hipótese (Alnaqeeb et al, 1984). Além disto, possíveis mudanças na arquitetura do EDL durante o crescimento devem ser levadas em consideração, uma vez que uma parte da extensibilidade muscular é devida à sua organização estrutural, ou seja, ao seu ângulo de penação (Ettema e Huijing, 1990).

Nossos resultados não sugerem alterações no CES devido à desnutrição, quando foram comparados os resultados entre os grupos normo e desnutrido, nas duas idades avaliadas. O único parâmetro que se mostrou significativamente modificado no sentido de maior extensibilidade foi a extensão máxima (Dmax), contra a ausência de alterações nos outros três parâmetros de avaliação da CES. Entretanto, devido à forma hiperbólica da curva tensão/extensão, a determinação do valor de Dmax sobre esta relação - representado pelo ponto de intersecção da mesma com o eixo x- é delicada. Desta maneira, a importância desta diferença estatística pode ser questionável, sendo prudente se optar por uma interpretação de não modificação nos parâmetros de CES.

Novamente, pode-se hipotetizar, como referido para a alteração na Vmax, que as fibras musculares em período de maturação poderiam apresentar características

mecânicas diferentes devido à influência da desnutrição. Um outro raciocínio possível para explicar a ausência de modificações no CES, aparentemente antagônicas à variação verificada na V_{max} , seria uma modificação no sentido inverso das propriedades ativas e passivas neste componente, causando uma redução da extensibilidade na parte passiva deste componente. Esta hipótese de aumento da resistência da parte passiva do CES é apoiada pelo aumento de resistência da CEP observada nos animais desnutridos aos 25 dias. De fato, o aumento da resistência no CEP poderia expressar um aumento na quantidade de colágeno, que poderia também se produzir nas estruturas tendinosas, levando assim a um aumento da resistência passiva do CES. Um estudo realizado em humanos sujeitos a condições de microgravidade relata resultados neste sentido: foram encontrados diferentes adaptações na relação tensão-extensão, que seguiam tendências antagônicas nas frações passiva e ativa do CES (Lambertz et al, 2001).

No que diz respeito às propriedades do Componente Elástico em paralelo (CEP), nossos resultados não demonstram uma diminuição na tensão passiva em ambos os músculos, com o aumento da idade. Sabe-se que o CEP é influenciado pela quantidade de tecido colágeno (Kovanen et al, 1984b; Alnaqeeb et al, 1984), assim como a um espessamento no endomísio (Alnaqeeb et al, 1984). Além disto, os filamentos de titina são também uma fonte de tensão passiva ao nível da fibra muscular (Horowitz et al, 1986; Anderson et al, 2002), assim como a rede de proteínas endo e exo-sarcômeros, como a desmina (Salviati et al, 1990; Anderson et al, 2002).

Um músculo lento contém mais tecido colágeno que um músculo rápido, e desenvolve por conseguinte uma tensão passiva mais importante (Kovanen et al, 1989). Diversos trabalhos relataram diferenças entre fibras de diferentes propriedades passivas, entre fibras extraídas de de um mesmo músculo (Mutungi et al, 2003; Mutungi e Ranatunga, 1996; 1998; Wang 1991), enquanto outros estudos não encontraram o

mesmo resultado (Anderson et al, 2002; Horowitz, 1992). Isto leva ao questionamento se as propriedades passivas dependem do tipo de fibra ou do tipo de músculo do qual ela foi retirada. De qualquer modo, é pouco provável que esta diminuição da tensão passiva esteja ligada a modificações da tipologia do músculo.

Ao nível do músculo inteiro, Kovanen e cols (1984), a concentração de colágeno no solear aumenta pouco entre as idades de 1 e 4 meses, no rato, sem modificação na resistência passiva. Já Alnaqeeb e cols (1984) relatam que se a concentração de colágeno não evolue entre 21 e 84 dias de idade no solear de rato, no EDL esta concentração chega a dobrar no mesmo período. Esta evolução na concentração de colágeno em músculos lentos e rápidos parece ser confirmada em outras espécies, como no coelho (Ducomps et al, 2003), onde foi verificado um aumento no EDL, mas uma diminuição no musculo lento semimembranoso, entre as idades de 50 e 140 dias, quando esta espécie atinge a maturação sexual. Ducomps e cols (2003) relatam ainda um aumento na tensão passiva em ambos os músculos estudados, e sugerem que a correlação entre esta tensão passiva e a concentração de colágeno nem sempre é sistemática. Estudos usando a mesma metodologia aqui relatada relatam um aumento na força passiva com a idade em ratos de 30 e 120 dias de idade, questionando a participação da proteína estrutural titina no processo de aumento da resistência passiva no músculo em desenvolvimento, mas não se encontraram modificações relacionadas à idade no solear (Bensamoun et al, 2006). As diminuições de tensão passiva encontradas neste trabalho não estão de acordo nem com os aumentos relatados por Bensamoun et al (2006) e Ducomps et al (2003), nem com a ausência de modificações relatada por Kovanen (1989). A falta de concordância entre a literatura e de suporte em análises morfológicas mais precisas em nosso trabalho não nos permitem elaborar uma

conclusão adequada sobre a diminuição da tensão passiva com o aumento da idade, aqui encontrada.

Os animais desnutridos apresentaram aumento da resistência passiva no CEP, quando comparados aos animais normais, apenas aos 25 dias. Levando em consideração que o tecido conjuntivo contribui com alterações neste componente, mesmo havendo diferentes opiniões neste sentido, conforme descrito no parágrafo anterior, poderia ser sugerido que a desnutrição induziria a modificações do tecido conjuntivo. Os trabalhos encontrados sobre este assunto, entretanto, relatam que a desnutrição induzida durante o período gestacional e de aleitamento em ratos não alterou a proporção de tecidos conectivos no músculos EDL ou solear (Bedi et al, 1982). Num outro estudo, foi verificado em ratos desnutridos a partir do desmame que o tecido conectivo muscular diminuiu com a idade, mais precisamente da idade adulta à senescência, mas a proporção tecido conectivo/tecido muscular aumentou com a idade (Boreham et al, 1988). Uma possível explicação para o aumento na tensão passiva nos desnutridos aos 25 dias poderia advir de uma modificação estrutural da rede ou da proteína titina, além de uma modificação do colágeno. No presente trabalho, não foram realizadas avaliações morfológicas ou químicas para descrição de possíveis alterações estruturais. No que diz respeito à duração destes efeitos, ambos os músculos recuperaram suas características de tensão passiva aos 90 dias, demonstrando que qualquer que tenha sido a influência sobre o CEP na idade precoce, a recuperação nutricional foi capaz de reverter.

Como observação final quanto ao estudo da biomecânica muscular, consideramos importante ressaltar que ainda são escassos os estudos sobre a caracterização das propriedades contáteis e elásticas em animais durante o período precoce do desenvolvimento. Mais ainda sobre possíveis repercussões de agressões que atuem durante este período no desenvolvimento destas características. O músculo em

fase de maturação apresenta grande plasticidade e adaptabilidade, assim como os demais sistemas orgânicos. Segundo os resultados obtidos no presente estudo e provavelmente devido às adaptações que podem se produzir neste período de maturação precoce, o músculo em desenvolvimento não parece seguir o mesmo esquema de organização em termos de respostas biomecânicas, como se mostra no músculo maduro.

V. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

RESUME EN FRANCAIS : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

De ces études, il ressort que :

- *La dénutrition précoce induit un retard dans le développement des patterns réflexes primitifs. Même si les acquisitions motrices sont achevées à l'âge adulte, les délais dans la maturation des réflexes ont induit une moins grande expérience sensorielle pendant une période où ces informations ont un rôle considérable sur le développement du cortex sensoriel et moteur. Cette moins grande expérience sensorielle pourra alors être préjudiciable sur l'acquisition de tâches motrices dans des étapes postérieures.*
- *Les données obtenues sur l'activité locomotrice suivent le même raisonnement du paragraphe précédent. De la même façon, l'hyperactivité non contrôlée à la fin de la période néonatale peut entraîner des préjudices dans la construction des activités exploratoires et cognitives.*
- *Les modifications de l'activité locomotrice, dans le sens d'une hypoactivité dans les deux premières semaines de la vie, suivie d'une hyperactivité dans la troisième semaine, peuvent avoir des conséquences sur la fonction musculaire, conséquences additionnelles aux effets directs de la dénutrition sur le muscle.*
- *La dénutrition entraîne des modifications des caractéristiques biomécaniques contactiles et élastiques musculaires essentiellement à l'âge de 25 jours. Ces modifications, qui sont dues à une action pendant la période de développement musculaires, suggèrent des transformations plus complexes tant au niveau typologique qu'au niveau métabolique, structural ou des cinétiques ioniques, que celles que l'on peut observer sur le muscle adulte ayant subi une période d'hypo ou d'hyperactivité.*

- *Les modifications des caractéristiques biomécaniques musculaires auraient-elles des répercussions sur l'activité locomotrice ?*

- *La récupération de la majeure partie des propriétés biomécaniques à l'âge adulte fait penser à la possibilité d'une réorganisation d'un système organique en développement. Le concept d'un mécanisme protecteur des agressions précoces dans le sens d'une réorganisation des fonctions en vue de la préservation des fonctions vitales peut alors être suggéré.*

Les résultats des études de ce travail permettent de conclure que :

- *Les comportements locomoteurs peuvent d'être bien représentés à partir de l'évaluation de l'ontogenèse des réflexes et au système d'évaluation de l'activité locomotrice mis en place au laboratoire, à fin d'apprécier d'éventuelles altérations survenant lors du développement précoce.*

- *Le système de monitoring de l'activité locomotrice qui a été élaboré et utilisé dans ce travail s'est montré utile pour établir un pattern d'évolution de la locomotion, de que on peut se servir comme un modèle pour l'évaluation des alterations du développement normal. Par l'utilisation de cet instrument, il a été possible déterminer que la dénutrition néonatale a induite initialement à un ralentissement de l'activité locomotrice, suivi d'une altération des patrons pendant le développement de la marche.*

- *La sensibilité du muscle squelettique à l'agression nutritionnelle précoce est démontrée non seulement par une réduction de la force produite mais aussi par des modifications des caractéristiques contractiles (cinétique de contraction et vitesse maximale de raccourcissement) et élastiques (augmentation de la résistance à l'étirement de la CEP).*

- *, qui réduit la croissance musculaire dès la période néonatale jusqu'à l'âge adulte, même après la récupération nutritionnelle.*

- *Les modifications des certaines caractéristiques mécaniques différents selon le type de muscle est vraisemblablement à mettre en relation avec des modifications de l'activité locomotrice perçues chez les animaux dénutris.*

- *Les effets sur la croissance du corps et du muscle persistent de façon durable jusqu'à l'âge adulte alors que la plupart des modifications des propriétés mécaniques observées à 25 jours sont récupérées à l'âge adulte. La récupération de ces paramètres peut être liée soit à la récupération nutritionnelle post sevrage, soit à des mécanismes d'adaptation visant à rattraper le déficit fonctionnel précoce.*

No decorrer deste trabalho, diversos aspectos foram avaliados e discutidos no sentido de elucidar as possíveis repercussões da desnutrição precoce sobre o desenvolvimento da atividade locomotora, através de um modelo experimental.

A construção de padrões locomotores envolve numerosas funções e sistemas fisiológicos, e recebe influências de fatores endógenos e exógenos ao organismo. Assim, dificilmente a totalidade desses aspectos –integridade de cada sistema orgânico envolvido nos comportamentos motores e influências exógenas- poderia ser agrupada em um trabalho de pesquisa. Procurou-se essencialmente abordar diferentes aspectos de avaliação, como a evolução da movimentação reflexa mais primitiva, a mensuração da evolução da atividade locomotora e as adaptações do músculo esquelético durante a fase precoce de crescimento e desenvolvimento, assim como relacionar as repercussões da desnutrição precoce sobre o desenvolvimento destes aspectos.

Dos estudos experimentais aqui realizados, amparados pela literatura, pode-se reforçar a idéia de uma sequência precisa de eventos maturacionais que acompanha o desenvolvimento precoce e, a partir dos resultados obtidos, reunir elementos para

melhorar a compreensão de como cada aspecto pode contribuir com o desenvolvimento de uma locomoção madura.

A aquisição de habilidades motoras é uma tarefa duradoura e dependente de experiências sensoriais muito precoces. A mobilidade primitiva decorrente da movimentação reflexa é uma das primeiras ferramentas a ser usada na vida pós-natal. No rato, como no ser humano, os diversos reflexos primitivos permitem que a movimentação passe por um refinamento, de modo a estabelecer a transição entre movimentos primitivamente globais para segmentares. As rotações de tronco provocadas pelos reflexos de endireitamento, por exemplo, induzem a alongamentos de cadeias musculares e permitem uma maior estimulação sensorial e proprioceptiva, favorecendo o reconhecimento inicial do esquema corporal e estimulando o desenvolvimento de reações labirínticas de retificação e equilíbrio. Gradativamente, pela repetição destes movimentos, um aprendizado motor vai sendo estabelecido, por mecanismos de feed-back. Obviamente, todo este conjunto de fatores leva ao uso da força muscular, involuntário de início, mas que se mostra como importante meio para o desenvolvimento da força muscular, que será indispensável para a sustentação corporal e deslocamentos durante a locomoção. Reações que envolvem o uso de outros sistemas sensoriais, como a reação ótica de retificação por exemplo, ao mesmo tempo que irão reforçar o desenvolvimento das outras reações, serão também dependentes da evolução correta de etapas reflexas precedentes, que servem como preparação do corpo para a movimentação mais refinada e automática, o que desencadeia finalmente em padrões adequados de postura e locomoção.

Verificamos no primeiro estudo deste trabalho que a desnutrição precoce causou um atraso no desenvolvimento dos padrões reflexos primitivos. Mesmo que as aquisições tenham sido alcançadas, o atraso das mesmas induziu a uma menor

experiência sensorial num período onde as informações sensório-motoras deveriam estar sendo impressas no córtex sensorial e motor no SNC. Associando esse empobrecimento de informações a uma lentificação dos potenciais de ação, como referido na literatura, o indivíduo em desenvolvimento sofre um atraso em suas funções motoras que não lhe permitirá desempenhar adequadamente as habilidades esperadas em uma fase posterior, na qual a sua movimentação independente e direcionada é o principal canal de integração com o ambiente. Num animal como o rato, isto poderia interferir com a busca do alimento ou com reações de fuga diante de situações de perigo, ou seja, interferir com a própria sobrevivência. No ser humano, não apenas a locomoção *per si* é prejudicada, mas também toda uma função de aprendizado a partir da manipulação do meio ambiente, o que pode repercutir nas funções cognitivas mais tardiamente.

Os achados do nosso segundo estudo, sobre a evolução da atividade locomotora, podem ser associados ao raciocínio anterior. Através do desenvolvimento de um sistema de monitoramento para mensurar a atividade locomotora, verificou-se que a desnutrição provocou inicialmente uma lentificação na movimentação do animal, e foram discutidos alguns aspectos de comportamento alimentar e relacionamento do filhote com a mãe e o restante da ninhada. Neste período pós-natal precoce, são estabelecidos diversos comportamentos numa proporção determinada, o que permite ao animal desenvolver sua capacidade exploratória. Esta capacidade não apenas permite o desenvolvimento cognitivo, mas interfere no refinamento motor, estabelecendo uma atividade motora mais organizada e direcionada. O impedimento ao desenvolvimento adequado da capacidade exploratória se apresenta assim como um prejuízo para a movimentação proposicional. Nossos resultados apontam para uma exacerbação da atividade locomotora ao final do período neonatal devido à desnutrição, e diversas intercorrências

poderiam ser relacionadas. O atraso na maturação do SNC induzido pela desnutrição e extensamente descrito na literatura, causado por alterações em eventos celulares no período crítico do desenvolvimento, pode ser apontado como o fator primordial para a lentificação inicial no desenvolvimento sensório-motor. Por outro lado, a diminuição nas experiências sensoriais pela lentificação do desenvolvimento motor se mostra como um feed-back negativo para a maturação de terminações nervosas e junções neuromusculares, repercutindo negativamente no desenvolvimento do SNC.

Seguindo o mesmo raciocínio, deve-se ter em mente a interdependência entre o desempenho da atividade motora e o desenvolvimento muscular. A força muscular depende da ação, sendo a hipoatividade um fator negativo para o desenvolvimento de um adequado tônus postural e motor. Numerosos relatos sobre os efeitos da hipoatividade são descritos na literatura, e suas repercussões sobre padrões posturais e na função muscular foram aqui discutidos. A desnutrição imposta no período crítico do desenvolvimento induziu a um atraso motor, numa condição comparável a uma redução da atividade. Se observado a partir deste ponto de vista, poderia ser prevista uma correlação com respostas musculares inadequadas. No nosso terceiro estudo, novos elementos foram introduzidos neste sentido: a desnutrição causou alterações peculiares nas propriedades contráteis e elásticas em músculos esqueléticos de diferentes características. Segundo a discussão elaborada a partir dos resultados, é muito provável que um atraso na maturação estrutural e funcional do músculo esquelético tenha se produzido por influência da desnutrição. Levanta-se aqui o questionamento do quanto essas alterações poderiam interferir sobre a ação muscular durante a evolução locomotora: por exemplo, um músculo que desenvolve menor força teria uma contribuição menos apropriada para o desenvolvimento de um ato motor determinado, prejudicando a função motora. Por outro lado, a estimulação sensorial reduzida por um

retardo no desenvolvimento do sistema nervoso poderia se apresentar como um fator de interferência no desenvolvimento estrutural e funcional do músculo.

É digno de nota que no período pós-natal, no rato, boa parte dos eventos celulares envolvidos no desenvolvimento de músculos esqueléticos já ocorreu, mesmo assim puderam ser observadas conseqüências da agressão nutricional. O restabelecimento tardio dos valores normais na avaliação da biomecânica muscular após a recuperação nutricional fala a favor da possibilidade de reorganização de um sistema orgânico em desenvolvimento. Obviamente, repercussões mais sutis, a nível metabólico e celular, devem ser investigadas. Mais ainda, um aspecto relacionado ao que é descrito por Ozanne e Hales (1998) e Hales e Baker (2001) sobre a hipótese do fenótipo protetor pode ser tranposto para a situação aqui encontrada: a deprivação nutricional no período precoce de desenvolvimento poderia induzir a modificações metabólicas no sentido de uma otimização de aproveitamento de substratos, visando a manutenção de funções fisiológicas para garantir a sobrevivência. Esta idéia, embora elaborada para explicar mecanismos associados a desequilíbrios na produção de insulina e captação da glicose em indivíduos desnutridos precocemente, tem sido extrapolada para outros sistemas, como o muscular (Vardi e Pinhas-Hamiel, 2000; Sayer e Cooper, 2005), mas ainda sem determinação de mecanismos de adaptativos ou de conseqüências tardias.

Os resultados dos estudos realizados no presente trabalho nos permitem concluir que:

- Através da avaliação da ontogênese reflexa os comportamentos locomotores primitivos no rato podem ser bem representados, de forma a apontar desvios no

desenvolvimento precoce, conforme observado pelos atrasos induzidos através da agressão nutricional.

- O sistema de monitoramento da atividade locomotora desenvolvido e aplicado no presente trabalho mostrou-se como uma ferramenta útil para estabelecer um padrão quantificável de evolução da locomoção, que pode servir como padrão na verificação de desvios no desenvolvimento normal. Através desta ferramenta de avaliação, foi possível determinar que desnutrição neonatal causou inicialmente um retardo no desencadeamento da atividade locomotora, seguido de padrões alterados durante o desempenho inicial da marcha.
- O músculo esquelético é sensível à agressão nutricional precoce, sofrendo uma redução no seu crescimento, que se apresenta agudamente acompanhando o déficit de crescimento corporal e perdura até a idade adulta, mesmo após a recuperação nutricional.
- As propriedades contráteis do músculo esqueléticos são afetadas pela desnutrição, não apenas com uma redução na produção de força, mas também com modificações na cinética da contração muscular e na relação força/velocidade de contração.
- As propriedades elásticas do músculo também se apresentam modificadas em consequência da desnutrição neonatal, apresentando-se globalmente com maior resistência passiva ao estiramento, ou seja, uma menor extensibilidade. Alterações aparentemente antagônicas ocorreram em elementos ativos e passivos do componente elástico em série.

- Os efeitos sobre o crescimento corporal e muscular persistiram de forma duradoura, até a idade adulta, mas a recuperação nutricional aparentemente favoreceu o restabelecimento de propriedades biomecânicas na idade adulta.

PERSPECTIVAS

RESUME EN FRANCAIS : PERSPECTIVES

Afin de répondre aux hypothèses posées dans ce travail, il peut être envisagée de:

- *Evaluer les repercussions tardives de la dénutrition précoce sur le développement de l'activité locomotrice chez rats à l'âge adulte.*
- *Evaluer les repercussions de la dénutrition induite dans la période pré-natale sur la biomécanique musculaire (travail déjà initié par la thèse de l'étudiante en co-tutelle Ana Elisa TOSCANO/ directeur Francis CANON).*
- *Utiliser méthodes plus fines pour caracteriser la maturation musculaire pendant la période du développement, ainsi que pour évaluer les consequences de la dénutrition précoce sur les caractéristiques typologiques musculaires, à travers des méthodes immunohistochimiques.*
- *Vérifier à travers des analyses biochimiques l'activité métabolique du muscle soumis à la dénutrition précoce.*
- *Analyser les propriétés contractiles et élastiques du muscle squelettique chez les enfants atteints de dénutrition précoce, dans la région Nordeste du Brésil, où la dénutrition est encore un problème de santé publique. Nous avons deux projets dans ce sens supportées par le CNPq.*

Alguns questionamentos permaneceram sem adequada resposta e hipóteses foram levantadas para tentar explicar as alterações observadas. Assim, algumas perspectivas para a continuação deste trabalho foram elaboradas e estudos com esses objetivos já foram planejados, tendo sido iniciados em parte a partir de projetos de pesquisa.

Assim, as perspectivas de continuação do presente trabalho são:

- Avaliar as repercussões tardias da desnutrição precoce sobre o desenvolvimento da atividade locomotora, em ratos na idade adulta.
- Avaliar as repercussões da desnutrição numa fase mais precoce, o período gestacional, sobre a biomecânica muscular (em andamento, tese de doutorado da aluna Ana Elisa Toscano).
- Realizar de forma mais refinada e precisa, uma caracterização da maturação muscular no período do desenvolvimento, assim como de possíveis repercussões da desnutrição precoce, através de métodos de imunohistoquímica para determinação da maturação de isoformas de miosina.
- Verificar através de dosagens bioquímicas a atividade metabólica do músculo submetido à desnutrição precoce.
- Estudar em crianças com história de desnutrição pregressa as propriedades contráteis e elásticas do músculo esquelético, através dos seguintes projetos de pesquisa a serem realizados na região Nordeste do Brasil, onde a desnutrição se apresenta como importante problema de saúde pública nos quais colaboram pesquisadores da Université de Technologie de Compiègne:
 - Desnutrição precoce: eventuais repercussões sobre o desenvolvimento do sistema locomotor em crianças de uma comunidade rural do estado de Pernambuco, aprovado pelo CNPq sob o nº 505939/2004-2, em andamento.

- Desnutrição Neonatal: Eventuais repercussões sobre a biomecânica do sistema locomotor em crianças do sertão de Pernambuco, aprovado pelo CNPq sob o nº 402149/2005-0, a ser iniciado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Agbulut, O.; Noirez, P.; Beaumont, F.; Butler-Browne, G. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development in mice. *Biology of the cell*, 95: 399-406, 2003.
2. Akbari, H.M.; Whitaker-Azmitia, P.M.; Azmitia, E.C. Prenatal cocaine decreases the trophic factor S-100 β and induced microcephaly: reversal by postnatal receptor agonist. *Neuroscience Letters*, 170: 141-144, 1994.
3. Almeida-Silveira, M.I.; Pérot, C.; Pousson, M.; Goubel, F. Effect of stretch shortening cycle training on mechanical properties and fiber type transition in soleus muscle. *Pflugers Archives*, 427: 289-294, 1994.
4. Almeida-Silveira, M.I.; Lambertz, D.; Pérot, C.; Goubel, F. Changes in stiffness induced hindlimb suspension in rat Achilles tendon. *European Journal of Applied Physiology*, 81: 252-257, 2000.
5. Alnaqeeb M.A.; Al Zaid N.S.; Goldspink G. Connective tissue changes and physical properties of developing and ageing skeletal muscle. *Journal of Anatomy*, 139: 677-89, 1984.
6. Anderson, J.; Joumaa, V.; Stevens, L.; Neagoe, C.; Li, Z.; Mounier, Y.; Linke, W.A.; Goubel, F. Passive stiffness in soleus muscles from desmin knockout mice are not due to titin modifications. *PflugersArchive*, 444: 771-776, 2002.
7. Bacou, F. Vigneron, P. Propriétés des fibres musculaires squelettiques. I. Influence de l'innervation motrice. *Reproduction, Nutrition and Development*, 28: 1387-1453, 1988.

8. Baldwin, K.M.; Haddad, F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *Journal of Applied Physiology*, 90: 345-357, 2001.
9. Barker, D.J.P.; Clark, P.M. Fetal undernutrition and disease en later life. *Reviews of Reproduction*, 2: 105-112, 1997.
10. Barreto-Medeiros, J.M.; Cabral-Filho, J.E.; Souza, S.L.; Freitas-Silva, S.R.; Mendes-da-Silva, C.; Deiró, T.C.B.J.; Monteiro, J.S.; Guedes, R.C.A.; de Castro, C.M.M.; Manhães-de-Castro, R. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. *Nutritional Neuroscience*, 5: 211-214, 2002.
11. Barros, K. M. F. T.; Câmara-Fragoso, A.G.; Bezerra-de-Oliveira, A. L.; Cabral-Filho, J.E.; Manhães-de-Castro, R. Do environmental influences alter motor development? A comparison among children from day-care centers and private schools. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 61: 170-175, 2003.
12. Barros, K.M.F.T; Manhães-de-Castro, R.; Lopes-de-Souza, S.; Matos, R.J.; Deiró, T.C.; Cabral-Filho, J.E.; Canon, F. A Regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutritional Neuroscience*, 9: 99-104, 2006.
13. Bedi, K.S.; Birzaglis, A.R.; Mahon, M.; Smart, J.L.; Wareham, A.C. Early life undernutrition in rats. I. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed and adult animals. *British Journal of Nutrition*, 47: 417-430, 1982.
14. 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.

15. 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.
16. Bensamoun, S.; Stevens, L.; Fleury, M.J.; Bellon, G.; Goubel, F.; Ho Ba Tho, M.C. Macroscopic-microscopic characterization of the passive mechanical properties in rat soleus muscle. *Journal of Biomechanics*, 39: 568-578, 2006.
17. Bewick, G.S.; Reid, B.; Jawaid, S.; Hatcher, T.; Shanley, L. Postnatal emergence of mature release properties in terminals of rat fast-and slow-twitch muscles. *European Journal of Neuroscience*, 19: 2967-2976, 2004.
18. Bhatia, V.P.; Katyar, G.P.; Agarwal, K.N. Effect of intrauterine nutritional deprivation on neuromotor behavior of the newborn. *Acta Paediatrica Scandinavia*, 68: 561-566, 1979.
19. Bissonete, D.J.; Madapallimatan, A.; Jeejeeboy, K.N. Effect of hypoenergetic feeding and high-carbohydrate refeeding on muscle titanic tension, relaxation rate, and fatigue in slow- and fast-twitch muscles in rats. *American Journal of Clinical Nutrition* 66: 293-303, 1997.
20. Blatt, G.J.; Chen, J.C; Rosene, D.L.; Volicer, L.; Galler, J.R. 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.
21. Bly L. What is the role of sensation in motor learning? What is the role of feedback and feedforward? *NDTA Network*, sep-oct: 3-8 1996.
22. Boreham, C.A.G., Watt, P.W.; Willians, P.E.; Merry, B.J.; Goldspink, G.; Goldspink, D.F. Effects of ageing and chronic dietary restriction on the

- morphology of fast and slow muscles of the rat. *Journal of Anatomy*, 157: 111-125, 1988.
23. Bosco C, Tihanyi J, Komi PV, Fekete G, Apor P. Store and recoil of elastic energy in slow and fast types of human skeletal muscles. *Acta Physiologica Scandinavia*, 116: 343-349, 1982.
 24. Bottinelli, R.; Schiaffino, S.; Reggiani, C. Force_velocity relations and myosin heavy chain isoform composition of skinned fibers from rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 437: 665-672, 1991.
 25. Bottinelli, R.; Betto, R.; Schiaffino, S.; Reggiani, C. Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*, 478: 341-349, 1994a.
 26. Bottinelli, R.; Betto, R.; Schiaffino, S.; Reggiani, C. Unloaded shortening velocity and myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*, 478: 341-349, 1994b.
 27. Boxwell, J.; Ayson, P.; Ramenofsky, M. Growth and metabolic parameters in pups of undernourished lactating rats. *Physiology and Behavior*, 57: 469-475, 1995.
 28. Bril B. Une approche écologique de l'acquisition de la marche chez le jeune enfant. *Évolutions psychom*, 9: 171-181, 1997.
 29. Brocard, F.; Vinay, L.; Clarac, F. Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. *Developmental Brain Research*, 117: 81-89, 1999.

30. Brown, L; Pollit, E. Malnutrition, poverty and intellectual development. *Scientific American*, : 38-43, 1996.
31. Brozanski, B.S.; Daaod, M.J.; LaFramboise, W.A.; Watchko, J.F.; Foley, T.P.Jr; Butler-Browne, G.S.; Whalen, R.G.; Guthrie, R.D.; Ontell, M. Effects of perinatal undernutrition on elimination of immature myosin isoforms in the rat diaphragm. *American Journal of Physiology*, 261: L49-L54, 1991.
32. Brozanski, B.S.; Watchko, J.F.; O'Day, T.L.; Guthrie, R.D. Effect of undernutrition on contractile and fatigue properties of rat diaphragm during development. *Journal of Applied Physiology*, 74: 2121-2126, 1993.
33. Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *Journal of Physiology*, 234: 723-748, 1973.
34. Canon, F.; Goubel, F. Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat soleus muscle. *Pflugers Archive*, 1995: 429, 332-337.
35. Cavagna, C.A. The series elastic component of frog gastrocnemius. *Journal of Physiology*, 206: 257-262, 1970.
36. Chen, J.; Turiak, G.; Galler, J.; Volicer, L. Effect of prenatal malnutrition on release of monoamines from hippocampal slices. *Life Sciences*, 57: 1467-1475, 1995.
37. Clarac F, Vinay L, Cazalets JR, Fady JC, Jamon M. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Research and Brain Research Reviews*, 28: 35-43, 1998.
38. Clarac F.; Brocard F.; Vinay L. The maturation of locomotor networks. *Progress in Brain Research*.143: 57-66, 2004.

39. Clausen, R.; van Hardeveld, C.; Everts, M.E. Significance of calcium transport in control of energy metabolism and thermogenesis. *Physiological Reviews*, 3: 733-744, 1991.
40. Close RI. Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat during development. *Journal of Physiology*, 173: 74-95, 1964.
41. Close RI. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, 52: 129-197, 1972.
42. D'Albis, A.; Goubel, F.; Couteaux, R.; Janmot, C.. Mira, J. C. The effect of denervation on myosin isoform synthesis in rabbit slow-type and fast type muscles during terminal differentiation. Denervation induces differentiation in slow-type muscles. *European Journal of Biochemistry*, 223: 249-258, 1994.
43. Dobbing, J. Undernutrition and the developing brain. *American Journal of Diseases in Children*, 120: 411-415, 1970.
44. 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.
45. Dubovický, M.; Ujházy, E.; Jezová, D. Perinatal brain damage and neurobehavioral alterations in postnatal development. *Slovakofarma Revue*, 6: 46-49, 1996.
46. Ducomps, C.; Mauriège, P.; Darche, B.; Combes, S.; Lebas, F.; Doutreloux, J.P. Effects of jumping training on passive mechanical stress and stiffness in rabbit skeletal muscle: role of collagen. *Acta Physiologica Scandinavia*, 178: 215-224, 2003.

47. Dwyer, C.M.; Stickland, N.C. Does the anatomical location of a muscle affect the influence of undernutrition on muscle fibre number? *Journal of Anatomy*, 181: 373-376, 1992.
48. Dwyer, C.M.; Stickland, N.C.; Fletcher, J.M. The influence of maternal malnutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *Journal of Animal Science*, 72: 911, 1994.
49. 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.
50. Eken T, Gundersen K. Electrical stimulation resembling normal motor-unit activity: effects on denervated fast and slow rat muscles. *Journal of Physiology*, 402: 651-669, 1988.
51. Ellender, G.; Feik, S.A.; Carach, B.J. Periosteal structure and development in a rat caudal vertebra. *Journal of Anatomy*, 158: 173-187, 1988.
52. Ettema GJC, Huijing PA. Architecture and elastic properties of the series element of muscle-tendon complex. **In:** Winters, J.M.; Woo, S.L.Y. (ed) *Muscle Multiple Systems: Biomechanics and Movement Organization*. Springer-Verlag, New York, p 57-68, 1990.
53. Fiorotto, M.L.; Davis, T.A.; Reeds, P.J. Regulation of myofibrillar protein turnover during maturation in normal and undernourished rat pups. *American Journal of Physiology*, 278: R845-R854, 2000.
54. Fox, W.M. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Animal Behavior*, 13: 234-241, 1965.

55. Gareis, H.; Solomonow, M.; Baratta, R.; Best, R.; d'Ambrosia, R. The isometric length-force models of nine different skeletal muscles. *Journal of Biomechanics*, 25: 903-916, 1992.
56. Glore, S.R.; Layman, D.K. Cellular growth of skeletal muscle in weanling rats during dietary restrictions. *Growth*, 47: 403-10, 1983.
57. Goss, R.J. The strategy on growth. **In:** Goss, R.J. (ed) The physiology of the growth. New York, Academy Press, 1-8. 1978.
58. Goubel, F, Lenseil-Corbeil, G. Biomécanique: Éléments de mécanique musculaire. Paris: Masson. 2003.
59. Goubel F, Marini J.F. Fibre type transition and stiffness modification of soleus muscle of trained rats. *Pflugers Archive*, 410: 321-325, 1987.
60. Gramsbergen, A.; Westerga, J. Locomotor development in undernourished rats. *Behavioral Brain Research*, 48: 57-64, 1992.
61. Gramsbergen, A. Posture and locomotion in the rat: independent or interdependent development? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22: 547-553, 1998.
62. Grantham-Mcgregor, S.; Schofield, W.; Powell, C. Development of severely malnourished children who received psychosocial stimulation: six-year follow up. *Pediatric*, 79: 247-254, 1987.
63. Granzier, H.; Labeit, S. Cardiac titin: an adjustable multifunctional spring. *Journal of Physiology*, 541: 335-342, 2002.
64. Granzier, H.; Helmes, M.; Cazorla, O.; McNabb, M.; Wu, Y.; Yamasaki, R.; Redkar, A. Kellermayer, M.; Labeit, S.; Trombitas, K. Mechanical properties of titin isoforms. *Advances in Experimental, Medicine and Biology*, 481: 283-300, 2000.

65. Gray, G.; Leber, S.; Sanes, J. Migratory patterns of clonically related cells in the developing central nervous system. *Experientia*, 46: 929-940, 1990.
66. Greenhold, P.L.; Hunt, A.S.; Hermanson, J.W.; Bell, A.W. Effects of birth weight and postnatal nutrition of neonatal sheep: II. Skeletal muscle growth and development. *Journal of Animal Science*, 78: 50-61, 2000.
67. Gressens, P.; Muaku, S.M.; Besse, L.; Nsegbe, E.; Gallego, J.; Delpech, B.; Gaultier, C.; Evrard, P.; Ketelslegers, J.M.; Maiter, D. Maternal protein restriction early in pregnancy alters brain development in the progeny. *Developmental Brain Research*, 103: 21-35, 1997.
68. Guedes, R.C.A.; Amancio-dos-Santos, A.; Manhães-de-Castro, R.; Costa-Cruz, R.R.G. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early malnourished rats. *Nutritional Neuroscience*, 5: 115-123, 2002.
69. Gundersen K, Eken T. The importance of frequency and amount of electrical stimulation for contractile properties of denervated rat muscles. *Acta Physiologica Scandinavica*, 145: 49-57, 1992.
70. Hales, C.N.; Barker, D.J. The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*, 60: 5-20, 2001.
71. Hales, C.N.; Barker, D.J. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35: 595-601, 1992.
72. Harrison, A.P.; Tivey, D.R.; Clausen, T.; Duchamp, C., Dauncey, M.J. Role of thyroid hormones in early postnatal development of skeletal muscle and its implication for undernutrition. *British Journal of Nutrition*, 76: 841-855, 1996.

73. Hediger, M.L.; Overpeck, M.D.; Kuczmarski, R.J.; McGlynn, A.; Maurer, K.R.; Davis, W.W. Muscularity and fatness of infants and young children born small- or large-for-gestacional age. *Pediatrics*, 102: E60, 1998.
74. Hennig R, Lomo T. Effects of chronic stimulation on the size and speed of long-term denervated and innervated rat fast and slow skeletal muscles *Acta Physiologica Scandinavia*, 130: 115-31, 1987.
75. Hill, A. V. The mechanism of muscular contraction. *Physiological Reviews*, 2: 310-341, 1922.
76. Hill, A. V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proceedings of the Royal Society, B126*: 136-195, 1938.
77. Hill, D.K. Tension due to interaction between the sliding filaments in resting striated muscle. The effect of stimulation. *Journal of Physiology*, 192: 637-683, 1968.
78. Ho KW, Heusner WW, Van Huss WD. Postnatal muscle fibre histochemistry in the rat. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 76: 37-49, 1983.
79. Horowitz, R.; Kempner, E.S.; Bisher, M.E. Podolsky, R.J. A physiological role of titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*, 323: 160-164, 1986.
80. Horowitz, R. Passive Force generation and titin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Biophysics*, 61: 392-398, 1992.
81. Huckstorf, B.L.; Slocum, G.R.; Bain, J.L.W., Reiser, P.M.; Sedlak, F.R.; Wong-Riley, M.T.T.; Riley, D.A. Effects of hindlimb unloading on neuromuscular development of neonatal rats. *Developmental Brain Research*, 119: 169-178, 2000.

82. Huijing, P.A.; Nieberg, S.M.; Van Den Veen, E.A.; Ettema, G.J. A comparison of rat extensor digitorum longus and gastrocnemius medialis muscle architecture and length-force characteristics. *Acta Anatomica*, 149: 111-120, 1994.
83. Huxley, A.F.; Simmons, R.M. proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature*, 233: 533-538, 1971.
84. Ishihara A, Taguchi S. Histochemical differentiation of fibers in the rat slow and fast twitch muscles. *Japanese Journal of Physiology*, 41: 251-258, 1991.
85. Ivanovic, D.M.; Olivares, M.G.; Castro, C.G.; Ivanovic, R.M. Nutrition and learning in Chilean School Children: Chile's Metropolitan Region Survey 1986 - 1987. *Nutrition*, 12: 122-129, 1996.
86. Jamon, M.; Clarac, F. Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. *Behavioral Neuroscience*, 112: 1218-1228, 1998.
87. Jansen, J.K.; Fladby, T. The perinatal reorganization of the innervation of skeletal muscle in mammals. *Progress in Neurobiology* 34: 39-90, 1990.
88. Johnson, J.D.; Wogenrich, W.J. Hsi, K.C.; Skipper, B.J.; Greenberg, R.E. Growth retardation during the suckling period in expanded litters of rats: observation of growth patterns and protein turnover. *Growth, Development and Aging*. 55: 263-273, 1991.
89. Joosten, E.A. J.; Bär, D.P.R. Axon guidance of outgrowing corticospinal fibres in the rat. *Journal of Anatomy* 194: 15-32, 1999.
90. Kablar, B; Krastel, K; Ying, C; Tapscott, S.J.; Goldhamer, D.J; Rudnicki, M.A. Myogenic determination occurs independently in somites and limb buds. *Developmental Biology* 15: 219-231, 1999.

91. Kablar B, Krastel K, Tajbakhsh S, Rudnicki MA. Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. *Developmental Biology* 15: 307-318, 2003.
92. Konishi M, Iwamoto S, Ohara H, Shimada M. Two-dimensional changes of muscle fiber types in growing rat hind limb. *Acta Anatomica Nipponica*, 75: 267-273, 2000.
93. Kovanen, V.; Suominen, H.; Heikkinen, E. Collagen of slow and fast muscle fibres in different types of rat skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, 52: 253-242, 1984a.
94. Kovanen, V.; Suominen, H.; Heikkinen, E. Mechanical properties in fast and slow skeletal muscle with special reference to collagen and endurance training. *Journal of Biomechanics*, 17: 725-735, 1984b.
95. Kovanen V. Effects of ageing and physical training on rat skeletal muscle. An experimental study on the properties of collagen, laminin, and fibre types in muscles serving different functions. *Acta Physiologica Scandinavica*, 577(Suppl): 1-56, 1989.
96. Lago, E.S., Teodosio, N.R., Pessoa, D.C., Cabral-Filho, J.E. Longevity of malnourished rats fed with the regional basic diet (RBD) of the northeast of Brazil. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 47: 338-342, 1997.
97. Lambertz, D.; Pérot, C.; Kaspranski, R.; Goubel, F.; Effects of long-term spaceflight on mechanical properties of muscles in humans. *Journal of Applied Physiology*, 90: 179-188, 2001.
98. Laurentino, G.E.C. ; Arruda, I.K.G. ; Raposo, M.C.F. ; Batista-Filho, M. Short stature in school aged and under-five year-old children: a comparative analysis. *Reviews in Nutrition*, 19: 157-167, 2006.

99. Layman, D.K; Swan, P.B.; Hegarty, P.V.J. The effect of acute dietary restriction on muscle fibre number in weaning rats. *British Journal of Nutrition*, 45: 475-481, 1981.
100. Lefaucheur, L.; Ecolan, P.; Barzik, Y.M.; Marion, J.; Le Dividich, J. Early postnatal food intake alters myofiber maturation in pig skeletal muscle. *Journal of Nutrition*, 133: 140-147, 2003.
101. Leuba G.; Rabinowicz T. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. 1. Cellular densities, cortical volume and total number of cells. *Experimental Brain Research*, 37: 283-298, 1979.
102. Levitsky, D. A.; Barnes, R.H. Nutritional and environmental interactions in the development of the rat: Long-term effects. *Science*, 176: 68-71, 1972.
103. Lidov, H. G.W.; Molliver, M.E. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Research Bulletin*, 8: 389-430, 1982.
104. Lodder, M.A.; DeHaan, A.; Lind, A.; Sargeant, A.J. Changes in morphological and functional characteristics of male rat EDL muscle during growth. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 14: 45-53, 1993.
105. Lodder M.A.; de Haan A; Sargeant A.J. Effect of growth on efficiency and fatigue in extensor digitorum longus muscle of the rat. *European Journal of Applied Physiology*, 69: 429-434, 1994.
106. Lopes de Souza, S.; Manhães de Castro, R.; Nogueira, M.I. Comportamento alimentar neonatal. *Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil*, 3: 241-246, 2003.

107. Lynch, G.; Smart, J.L.; Dobbing, J. Motor coordination and cerebella size in adult rats undernourished in early life. *Brain Research*, 83: 249-259, 1975.
108. Magid, A.; Law, D.G. Myofibrils bear most of the resting tension in frog skeletal muscle. *Science*, 230: 1280-1281, 1985.
109. Marín, M.C.; Tomás, M.E.; Serres, C.; Mercuri, O. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition*, 125: 1017-1024, 1995.
110. Massion J. Postural control systems in developmental perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22: 465-472, 1998.
111. Mcconnel, S. The specification of neuronal identity in the mammalian cerebral cortex. *Experientia*, 46: 922-929, 1990.
112. McDonald, T.F.; Peltzer, S.; Trautwein, W.; Pelzer, D.J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiological Reviews*, 74: 365-375, 1994.
113. Medeiros, J.M.B.; Silva, C.M.; Sougey, E.; Costa, J.A.; Castro, C.M.M.; Manhães-de-Castro, R. Action of selective serotonin reuptake inhibitor on aggressive behavior in adult rat submitted to the neonatal malnutrition. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 59: 499-503, 2001.
114. Miles, F.A.; Evarts, E.V. Concepts of motor organization. *Annual Review of Psychology*, 30: 327-362, 1979.
115. Monteiro, C.A. O panorama da nutrição infantil nos anos 90. **In:** UNICEF. *Cadernos de Políticas Sociais - Série Documentos para Discussão*, n.1, Brasília, 1-14, 1996.

116. Morgane, P.J.; Miller, M.; Kemper, T.; Stern, W.; Forbes, W.; Hall, R.; Bronzino, J.; Kissane, E.; Hawrylewicz, E.; Resnick, O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2: 137-230, 1978.
117. Morgane, P.J.; Austin-Lafrance, R.; Bronzino, J.; Tonkiss, J.; Díaz-Cintra, S. Cintra, L.; Kemper, T.; Galler, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17: 91-128, 1993.
118. Morgane, P.J.; Mockler, D.J.; Galler, JR. Effects of perinatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26: 471-483, 2002
119. Mutungi, G.; Ranatunga, K.W. The viscous, viscoelastic and elastic characteristics of resting fast and slow mammalian (rat) muscle fibres. *Journal of Physiology*, 496: 827-836, 1996
120. Mutungi, G.; Ranatunga, K.W. Temperature-dependent changes in the viscoelasticity of intact resting mammalian (rat) fast- and slow twitch muscle fibres. *Journal of Physiology*, 508: 253-265, 1998.
121. Mutungi, G.; Trinick, J.; Ranatunga, K.W. Resting tension characteristics in differentiating intact rat fast- and slow-twitch muscle fibers. *Journal of Applied Physiology*, 95: 2241-2247, 2003.
122. Nagy, Z.M.; Porada, K.J.; Anderson, J.A .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.
123. Nishi, R. Neurotrophic factors: two are better than one. *Science*, 19: 1052-1053, 1994.

124. Noback, C.R.; Eisenman, L.M. Some effects of protein-calorie undernutrition on the developing central nervous system of the rat. *The Anatomical Record*, 201: 67-73, 1981.
125. Ontell, M.; Dunn, R.F. Neonatal muscle growth: a quantitative study. *American Journal of Anatomy*, 152: 539-555, 1978.
126. Ontell, M.; Kozeca, K. Organogenesis of the mouse extensor digitorum muscles: a quantitative study. *American Journal of Anatomy*, 171: 149-161, 1984.
127. Otellin, V.A.; Khozhai, L.I.; Gilerovich, E.G.; Korzhevskii, D.E.; Kotskin, D.E.; Belostotskaia, G.B. Damaging impacts at the critical time periods of prenatal ontogenesis as a factor modifying the cerebral structural development and postnatal behavior reactions. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*, 12: 32-35, 2002.
128. Oumi, M.; Miyoshi, M.; Yamamoto, T. The ultrastructure of skeletal and smooth muscle in experimental protein malnutrition in rats fed a low protein diet. *Archives of Histology and Cytology*, 63: 451-457, 2000.
129. Ozanne, S.E.; Hales, C.N. Thrifty yes, genetic no. *Diabetologia*, 41: 485-487, 1998.
130. Paixão, A.D.O.; Maciel, C.R.; Teles, M.B.B.; 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.
131. Pette, D. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 27: 423-448, 2002.

132. Pette, D.; Staron, R.S. Myosin isoforms, muscle fiber types and transition. *Microsc. Res. Tech.*, 50: 500-509, 2000.
133. Pette, D.; Vrbova, G. Neural control of phenotypic expression in mammals muscle fibers. *Muscle and Nerve*, 8: 676-689, 1985.
134. Picanço-Diniz, C.W.; Araújo, M.S.; Borba, J.M.C.; Guedes, R.C.A. NADPH-Diaphorase containing and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutritional Neuroscience*, 1: 35-48, 1998.
135. Pierobon-Bormioli S, Sartore S, Libera LD, Vitadello M, Schiaffino S. "Fast" isomyosins and fiber types in mammalian skeletal muscle. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 29: 1179-88, 1981.
136. Pond, W.G.; Yen, J.T.; Mersmann, H.J.; Maurer, R.R. Reduced mature size in progeny of swine severely restricted in protein intake during pregnancy. *Growth, Development and Aging*, 55: 77-84, 1990.
137. Pousson M, Perot C, Goubel F. Stiffness changes and fibre type transitions in rat soleus muscle produced by jumping training. *Pflugers Archive*, 419: 127-130, 1991.
138. Powell PL, Roy RR, Kanim P, Bello MA, Edgerton VR. Predictability of skeletal muscle tension from architectural determinations in guinea pig hindlimbs. *Journal of Applied Physiology*, 57:1715-21, 1984.
139. Proske, U.; Morgan, D.L. Do cross-bridges contribute to tension during stretch of passive muscle? *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 20: 433-442, 1999.

140. Punkt K, Krug H, Huse J, Punkt J. Age-dependent changes of enzyme activities in the different fibre types of rat extensor digitorum longus and gastrocnemius muscles. *Acta Histochemica*, 95: 97-110, 1993.
141. Punkt K, Krug H, Huse J, Punkt J. Region and age-dependent variations of muscle fibre properties. *Acta Histochemica*, 100: 37-58, 1998.
142. Punkt K, Naupert A, Asmussen G. Differentiation of rat skeletal muscle fibres during development and ageing. *Acta Histochemica*, 106: 145-54, 2004.
143. Purves, D. *Neural activity and the growth of the brain*. Cambridge: Cambridge University Press. 108 p. 1994.
144. Quek, V. S.; Trayhurn, P. Calorimetric study of the energetic of pregnancy in golden hamsters. *American Journal of Physiology*, 259: 807-812, 1990.
145. Ranatunga, K.W.; Thomas, P.E. Correlation between shortening velocity, force-velocity relation and histochemical fibre-type composition in rat muscles. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 11: 240-250, 1990.
146. Ranatunga, K.W. Temperature dependence of shortening velocity and rate of isometric tension development in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 329: 465-483, 1982.
147. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76^a rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123: 1939-1951, 1993.
148. Resnick, O.; Miller, M.; Forbes, W.; Hall, R.; Kemper, T.; Bronzino, J.; Morgane, P. J. Developmental protein malnutrition: influences on the central

- nervous system of the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 3: 233-246, 1979.
149. Riley, D.A.; Slocum, G.R.; Bain, J.L.W.; Sedlak, F.R.; Sowa, T.E.; Mellender, J.W. Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure and electromyography. *Journal of Applied Physiology*, 69: 58-66, 1990.
 150. Romani, S.A.M.; Lira, P.I.C. Fatores determinantes do crescimento infantil / Determinant factors of infant growth. *Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil*, 4: 15-23, 2004
 151. Rosembaum, R.A. Human motor control, San Diego:Academy Press, 1990
 152. Rosso, P.; Hormazabal, J.; Winick, M. Changes in brain weight, cholesterol, phospholipids and DNA content in marasmatic children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 23: 1275-1279, 1970.
 153. Rubinstein, N.A.; Kelly, A.M. Myogenic and neurogenic contributions to the developemnt of fast and slow twitch muscles in the rat. *Developmental Biology*, 62: 473-485, 1978.
 154. 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.
 155. Salviati, G.; Ceoldo, S.; Fachení-Cassano, G.; Betto, R. Morphological and functional, characterization of the endosarcomeric elastic filament. *American Journal of Physiology*, 259: 144-149, 1990.
 156. Sayer, A.A.; Cooper, C. Fetal programming of body composition and musculoskeletal development. *Early Human Development*, 81: 735-744, 2005.

157. Schiaffino, S.; Reggiani, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 77: 493-501, 1994.
158. Schmalbruch, H. Skeletal muscle. Springer, Heidelberg, 1985.
159. Schmid, M.; Conforto, S.; Lopez, L.; Renzi, P.; D'alessio, T. The development of postural strategies in children: a multifactorial study. *Journal of Neuroengineering and Rehabilitation*, 2: 29-39, 2005.
160. Segal SS, Faulkner JA. Temperature-dependent physiological stability of rat skeletal muscle in vitro. *American Journal of Physiology*, 248: C265-C270, 1985.
161. Segura, B.; Guadarrama, J.C.; Gutierrez, A.L.; Merchant, H.; Cintra, L.; Jiménez, I. Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutritional Neuroscience*, 4: 475-488, 2001.
162. Shorten, R. M. Muscle elasticity and human performance. **In:** *Medicine and Sport Science*, vol. 25, B. Van Gheluwe, J. Atha, Ed. Karger, Basel, 1987, 1-18.
163. Silvado, C.E.; Werneck, L.C. Alterations in the gastrocnemius muscle of undernourished suckling rats. *Muscle and Nerve*. 34: 72-77, 2006.
164. Smart, J.L.; 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: 85-95, 1971.
165. Smith D, Green H, Thomson J, Sharratt M. Oxidative potential in developing rat diaphragm, EDL, and soleus muscle fibers. *American Journal of Physiology*, 254: C661-C669, 1988.
166. Sobotka, T.J.; Cook, M.P.; Brodie, R.E. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Research*, .65: 443-457, 1974.

167. Somogyi, P.; Tamás, G.; Lujan, R.; Buhl, E. H. Salient features of synaptic organization in the cerebral cortex. *Brain Research Reviews*. 26: 113-135, 1998.
168. Stein, R.B.; Gordon, T.; Shriver, J. Temperature dependence of mammalian muscle contraction and ATPase activities. *Biophysics Journal*, 40: 97-107, 1982.
169. Stevens ED, Renaud JM. Use of dP/dt and rise time to estimate speed of shortening in muscle. *American Journal of Physiology*, 249: R510-3J, 1985.
170. Sturman, J. A.; Devine, E.; Resnick, O.; Morgane, P. J. Maternal protein malnutrition in the rat: effect on protein and two enzymes in the milk. *Nutrition Research*, 6: 437-442, 1986.
171. Sugiura T, Matoba H, Miyata H, Kawai Y, Murakami N. Myosin heavy chain isoform transition in ageing fast and slow muscles of the rat. *Acta Physiologica Scandinavica*, 144: 419-423, 1992
172. Svanberg, E.; Ohlsson, C.; Hyltander, A.; Lundholm, K.G. Gastrointestinal factors, and muscle innervation on activation of proteyn synthesis in skeletal muscles following oral refeeding. *Nutrition*, 15: 257-266, 1999.
173. Tamaki, T.; Uchyama, S. Absolute and relative growth of rat skeletal muscle. *Physiological Behavior*. 57: 913-919, 1995.
174. Tamaki, T.; Akatsuka, A.; Yoshimura, S.; Roy, R.R.; Edgerton, R. New fiber formation in the interstitial spaces of rat skeletal muscles during postnatal growth. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 50: 1097-1111, 2002.
175. Tamaki, Uchyama, S.; Nakano, S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Medicine in Sports and Exercise*. 24: 881-886, 1992.

176. Teodósio Nr, Cabral-Filho Je, Guedes Rca, Costa Ja, Ramos-Costa Fb, Silva At.
Learned and emotional behavior in chronically malnourished rats. *Acta Physiologica Latinoamericana* 29: 255–262, 1979.
177. Teodósio, N.R.; Lago, E.S.; Romani, S.A.M.; Guedes, R.C.A. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*.45: 533-545, 1990.
178. Turlejski, K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 56: 619-636, 1996.
179. Umezu Y, Hachisuka K, Ueda H, Yoshizuka M, Ogata, H, Fujimoto S.
Histochemical and immunological analyses of differentiating skeletal muscle fibers of the postnatal rat. *Acta Anatomica* (Basel), 143: 1-6, 1992.
180. Vandewalle, H. Ergométrie. **In:** Biologie de l'exercice musculaire. J.R. Lacour Ed., Masson, Paris, 123-156, 1992.
181. 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.
182. Vinay, L.; Ben-Mabrouk, F.; Brocard, F.; Clarac, F; Jean-Xavier, C; Pearlstein, E; Pflieger, J.F. Perinatal development of the motor systems involved in postural control. *Neural Plast.*, 12(2-3):131-9, 2005.
183. Walton, K.D.; Lieberman, D.; Llinás, A.; Begin, M.; Llinás, R.R. Identification of a critical period for motor development in neonatal rats. *Neuroscience*.51: 763-767, 1992.
184. Wang, K.; McCarter, R.; Wright, J.; Beverly, J.; Ramirez-Mitchell, R.
Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: a test of the

- segmental extension model of resting tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 64: 7101-1177, 1991.
185. Wank, V.; Bauer, R.; Walter, B.; Kluge, H.; Fischer, M.S.; Blickhan, R.; Zwiener, U. Accelerated contractile function and improved fatigue resistance of calf muscles in newborn piglets with IUGR. *American Journal of Physiology*, 278: R304-R310, 2000.
186. Ward, S.S.; Stickland, N.C. The effect of undernutrition in the early postnatal period on skeletal muscle tissue. *British Journal of Nutrition*, 69: 141-150, 1993.
187. Whalen, R.G.; Schwartz, K.; Bouveret, P.; Sell, S.M.; Gros, F. Contractile protein isozymes in muscle development: identification of an embryonic form of myosin heavy chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76: 5197-5201, 1979.
188. White, P.; Cataneo, D.; Dauncey, M.J. Postnatal regulation of myosin heavy chain isoform expression and metabolic enzyme activity by nutrition. *British Journal of Nutrition*, 84: 185-194, 2000.
189. Wilson, S.J.; Ross, J.J.; Harris, A.J. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. *Development*, 102: 815-821, 1988.
190. Winick, M. Malnutrition and brain development. *The Journal of Pediatrics*, 34: 1969.
191. Winick, M (ed.). *Current Concepts in Nutrition: Nutrition and Brain Development*, John Wiley & Sons: New York. 1: 1972.

192. Yamaguchi A, Horio Y, Sakuma K, Katsuta S. The effect of nutrition on the size and proportion of muscle fibre types during growth. *Journal of Anatomy*, 182: 29-36, 1993.
193. Zamenhov, S.; VanMarthens, E.; Guel, L. DNA and protein in neonatal rat brain: alteration by timing of maternal dietary protein restriction. *Journal of Nutrition*, 101: 1265-1270, 1971.
194. Zuurbier, C.J.; Huijing, P.A. Influence of muscle geometry on shortening speed of fibre, aponeurosis and muscle. *Journal of Biomechanics*, 25: 1017-1026, 1992.

PUBLICAÇÕES RESULTANTES, REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DA TESE

Resumos publicados:

SOCIETE DE BIOMECHANIQUE 2004/ CRETEIL, França

NEONATAL MALNUTRITION: EFFECTS ON ELASTIC AND CONTRACTILE
PROPERTIES OF RAT SOLEUS MUSCLE

FESBE 2005 / SP Brasil

NEONATAL MALNUTRITION: EFFECTS ON ELASTIC AND CONTRACTILE
PROPERTIES OF RAT SOLEUS MUSCLE

FESBE 2006 / SP Brasil

EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS DURANTE O PERIODO
NEONATAL UTILIZANDO UM SISTEMA DE PROCESSAMENTO DIGITAL DE
IMAGENS

EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O PERIODO NEONATAL NA EVOLUÇÃO
DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS: ANALISE POR SISTEMA DE
PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS

WORLD CONGRESS OF BIOMECHANICS 2006 / München- Alemanha

MECHANICAL PROPERTIES IN YOUNG AND ADULT RAT MUSCLES SUBMITTED
TO NEONATAL UNDERNUTRITION.

Artigos:

- ◆ Barros, K.M.F.T, Manhães-de-Castro, R., Lopes-de-Souza, S., Matos, R.J., Deiro, T.C., Cabral-Filho, J.E., Canon, F. A Regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutritional Neuroscience*. v.9, p.99-104, 2006.
- ◆ Barros KMFT., Manhaes-de-Castro R.; Goubel F., Canon F. Differential adaptations during brain growth spurt and in adult age in rat muscles. *Submetido à revista **Animal***.

*A*rchives of PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

*Formerly Archives Internationales de Physiologie
de Biochimie et de Biophysique*

Congrès SB – PARIS 2004
September 8-9-10



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Neonatal malnutrition: effects on contractile and elastic properties of rat soleus muscle

Barros KMFT¹, Canon F², Freitas-Silva SR¹, Manhaes-de-Castro R¹, Goubel F²

¹ Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

² UMR CNRS 6600, Université de Technologie de Compiègne, France

Introduction

In the process of skeletal muscle development, several major events proceed until the weaning age (i.e. 21 postnatal days). During the early period of life, exogenous influences, as nutritional disturbances, can impair the postnatal maturation of muscles. In this way, it was shown a structural alteration of sarcomeres (Oumi et al, 2000), a modification in protein metabolism (Fiorotto et al, 2000) as well as in contractile properties (Bissonnette et al 1997) of adult rats submitted to a protein undernutrition. The aim of this study was to assess the effect of a low protein-induced malnutrition during the neonatal period on contractile and elastic properties of young rat soleus muscle.

Methods

Male wistar rat pups were suckled in litters of 6. Mothers were fed during lactation with a 8% protein diet (malnutrition group, M) or a standard laboratory diet (18% protein, control group, C) until weaning. At 25 days of age, rat pups were anaesthetized and the soleus muscles were carefully excised and placed in a experimental chamber containing a ringer solution at 25°C. The distal part of soleus muscle was fixed to a force transducer. Its proximal extremity was connected to the moving part of an electromagnetic ergometer. Muscle was adjusted to its optimal length (L_0) and single twitches were elicited to measure contraction time (CT) and half relaxation time (HRT). Tetanic stimulations were delivered via two silver electrodes located on each side of the muscle. During the tetanic plateau (P_0), a series of dual controlled releases were performed in order to test the contractile and elastic characteristics (Fig 1). Series-elastic component (SEC) parameters were assessed by plotting the normalized shortening ($\Delta L/L_0$) against the normalized tension (P/P_0). According to Hill's equation, a linearization of force-velocity curves was performed by plotting for each isovelocity shortening (V) the normalized steady tension (P_s/P_0) against the ratio $(P_0 - P_s)/VP_0$. Parameters were expressed as means $\pm$ SD. A Wilcoxon test was applied to assess differences at 5% level of significance.

Results

Malnutrition induced a decrease of both body and soleus muscle weight (99 ± 10 g vs 53 ± 9 g, $p < 0.05$ and 65.6

± 6.1 mg vs 34.9 ± 7.9 mg, $p < 0.05$, respectively) whereas there was no difference in muscle to body weight ratio (0.657 ± 0.06 mg/g vs 0.649 ± 0.08 mg/g).

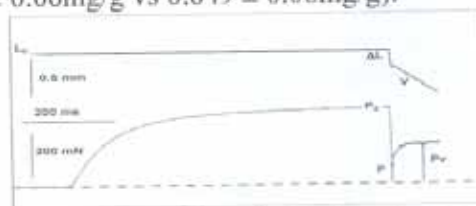


Fig. 1. Typical recording of a dual controlled release.

For M soleus, twitch tension and tetanic tension were 14% and 39% lower ($p < 0.05$) than that of C, respectively. Malnutrition led to an increase in CT (55.1 ± 4.4 ms vs 66.7 ± 7.4 ms, $p < 0.05$) and a prolongation in HRT (71.4 ± 21.5 ms vs 89.9 ± 10.8 ms, $p < 0.05$). For M rats, V_{max} significantly increased ($1.26 \pm 0.21 L_0/s$ vs $2.27 \pm 0.7 L_0/s$, $p < 0.05$). Compliance at P_0 and $0.2P_0$, maximal extension and maximal potential energy storable in SEC did not change.

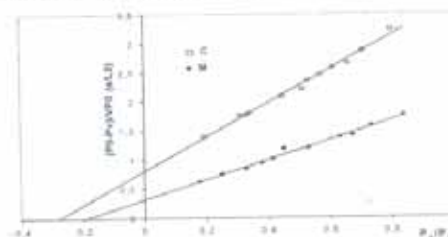


Fig. 2. Typical linearized force/velocity curves obtained for C (squares) and M (circles) soleus.

Discussion and conclusion

The first result of this study reported a well known malnutrition-induced muscle atrophy with a concomitant decrease in tension development. The increases in both CT and HRT in M group are interpretable in terms of modification in calcium movement in the sarcoplasmic reticulum and/or in the rate of cross-bridge cycling as a result of modification in maturation processes. Moreover, the large increase in V_{max} is ascribable to a delay in the natural process of slowing the muscle, by formation of slow-type myosin heavy chains. Finally, invariance in SEC characteristics should indicate that changes in its active part (i.e. cross-bridges) are counterbalanced by changes in its passive part (i.e. tendon). As judged by these results, it was concluded that neonatal malnutrition induced modifications in some mechanical properties of soleus muscle. This is probably due to an alteration in the events of the maturation processes, this period of life being a critical period for the normal development of skeletal muscle.

References

- Bissonnette DJ, Madapallimatam A and Jeejeebhoy KN (1997): *Am J Clin Nutr* 66: 292-303.
- Fiorotto ML, Davis TA and Reeds P (2000): *Am J Physiol* 278: R845-R854.
- Oumi M, Miyoshi M and Yamamoto T (2000): *Arch Histol Cytol* 63: 451-457.



DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE
(20 : 2005 : Águas de Lindóia - SP).

[Programa e resumos] : XXX Congresso Brasileiro de Biofísica ; XL Congresso Brasileiro de Fisiologia ; XXI Congresso Brasileiro de Investigação Clínica ; XXIX Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento; XXXVII Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Águas de Lindóia, 2005 / Brazilian Research Association in Vision and Ophthalmology , Sociedade Brasileira de Biociências Nucleares ; Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular ; Sociedade Brasileira de Biologia Celular ; Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo ; Sociedade Brasileira de Imunologia ; . – São Paulo : FESBE, 2005. CD-ROM.

Disponível em: <http://www.fesbe.org.br>

1. Investigação Clínica - Congressos, conferências, etc. 2. Neurociências e Comportamento - Congressos, conferências, etc. 3. Biofísica – Congressos, conferências, etc. 4. Fisiologia - Congressos, conferências, etc. 5. Farmacologia – Congressos, conferências, etc. I. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. II. Sociedade Brasileira de Biologia Celular III Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo IV. Sociedade Brasileira de Imunologia V. Brazilian Research Association in Vision and Ophthalmology

41.025 - Nutrição e Metabolismo

NEONATAL MALNUTRITION: EFFECTS ON ELASTIC AND CONTRACTILE PROPERTIES OF YOUNG RAT SOLEUS MUSCLE . ¹ BARROS, K. M. F. T. ^{**}; ² LA, M. ^{*}; ³ ARAGAO, RS ^{*}; ⁴ R, M. ; ⁵ R, F. . S. ^{**}; ⁶ F, C. ; ⁷ F, G. ; ¹ Nutrição, UFPE; ^{2,3,4,5} Nutrição, UFPE; ^{6,7} , CNRS; .

Objetivo:

To assess the effect of a low protein-induced malnutrition during the suckling period on contractile and elastic properties of young rat soleus muscle.

Métodos e Resultados:

Dams fed during lactation with a 8% protein diet (Malnutrition group/**M**, n=6) or a 18% protein, control group, **C**, n=12) until weaning (21 days). In the age of 25days: pups' soleus muscles were excised, and submitted to mechanical testing (Twitch kinetics:contraction time/CT, half relaxation time/HRT; Force/velocity and Tension/extension relation. **RESULTS: M** showed reduction (p<0.05) in both body(**C**=99,07 ± 10,33g ; **M**=53,30 ±8,97g) and muscle weight (**C**=65,56 ±6,15mg; **M**=34,87 ±7,98mg). However, the ratio Muscle Weight x Body Weight showed no difference. Force was reduced (p<0.05) in **M** (Twitch: C=78 ±18,54mN; Tetanus:

[Sistema FeSBE](#)

[Resumos Aceitos](#)

[Catalogação ICB/SBIB2005](#)

[Programa Preliminar](#)

[Preliminary Program](#)

[Programa O Jovem](#)

[Pré-Simpósio](#)

[Instruções p/ Resumo](#)

Resumo **R590-1****49.018 - Métodos, Equipamentos e Ensino****EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS DURANTE O PERÍODO NEONATAL UTILIZANDO UM SISTEMA DE PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS.**

¹ Freitas-Silva, S.R. ^{**}; ² Barros, K. M. F. T. ^{**}; ³ Toscano, A.E. ^{**}; ⁴ Mélo, L. A. ^{*}; ⁵ Aragão, R. S. ^{*}; ⁶ Manhaes-de-Castro, R. ^{*}; ⁷ Santos, W.P. ^{**}; ⁸ Portela, N.M. ^{*}; ⁹ Melo, C. H. S. ^{*}; ¹⁰ Costa da Silva, N.T.M. ^{*}; ¹¹ Souza, R.E. ^{*}; ^{1, 2, 3, 5, 6} Nutrição, UFPE; ⁴ Fisioterapia, UFPE; ^{7, 8, 9, 10, 11} Física, UFPE; .

Objetivo:

Utilizar um sistema para avaliação do desenvolvimento da atividade locomotora em ratos, durante o período neonatal. Variáveis físicas foram extraídas a partir da observação do comportamento de ratos em campo aberto, utilizando aquisição digital de vídeo e processamento das imagens obtidas (patente requerida).

Métodos e Resultados:

Ratos Wistar (idade: 8, 14, 17 e 21 dias pos-natais, n=6) foram observados num campo aberto circular ($\varnothing$ 1m), delimitado e monitorado por um sistema composto por câmera CCD, placa de aquisição de vídeo, microcomputador de software dedicado às tarefas de aquisição de vídeo. Através de técnicas de processamento digital de imagens, são extraídas do vídeo as posições assumidas pelo rato no campo aberto, traçando a trajetória percorrida durante o período de observação e para calcular a velocidade média, distância percorrida e a potência. O peso dos animais também foi aferido a cada idade. Para análise dos dados, utilizou-se ANOVA RM, seguida do teste de Dunnett ($*=p<0,05$). Resultados: Comparou-se os resultados de cada parâmetro com os valores obtidos aos 21 dias. A velocidade média (m/s) foi menor aos 8d ($0,013 \pm 0,005^*$) e aos 14d ($0,037 \pm 0,002^*$), não diferindo entre 17d ($0,072 \pm 0,022$) e 21d ($0,077 \pm 0,005$). A distância percorrida (m) foi menor aos 8d ($1,61 \pm 0,58^*$) e aos 14d ($4,47 \pm 0,28^*$), não diferindo entre 17d ($8,58 \pm 2,66$) e 21d ($9,05 \pm 2,87$). A potência (mW) foi menor aos 8d ($0,005 \pm 0,003^*$) e aos 14d ($0,064 \pm 0,006^*$), não diferindo entre 17d ($0,333 \pm 0,151$) e 21d ($0,536 \pm 0,238$).

Conclusões:

Os dados demonstram a maturação de padrões de locomoção no rato. A ausência de diferença entre 17 e 21d podem ser justificadas pelos padrões de locomoção e proporção de fibras musculares serem semelhantes ao adulto já no início da 3ª semana de vida.

Apoio Financeiro: CNPq, CAPES

Resumo **R600-1****41.045 - Nutrição e Metabolismo****EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O PERÍODO NEONATAL NA EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS: ANÁLISE POR SISTEMA DE PROCESSAMENTO DIGITAL DE**

IMAGENS. ¹ Barros, K. M. F. T. **; ² Freitas-Silva, S.R. **; ³ Toscano, A.E. **; ⁴ Mélo, L. A. *; ⁵ Aragão, R. S. *; ⁶ Manhaes-de-Castro, R. ; ⁷ Santos, W.P. **; ⁸ Portela, N.M. *; ⁹ Melo, C. H. S. *; ¹⁰ Costa da Silva, N.T.M. *; ¹¹ Souza, R.E. ; ^{1, 2, 3, 4, 5, 6} Nutrição, UFPE; ^{7, 8, 9, 10, 11} Física, UFPE; .

Objetivo:

Avaliar os efeitos da desnutrição, induzida durante o período neonatal, sobre a atividade locomotora em ratos. Variáveis físicas foram extraídas a partir da observação do comportamento de ratos em campo aberto, utilizando aquisição digital de vídeo e processamento das imagens obtidas (patente requerida).

Métodos e Resultados:

Ratos Wistar foram divididos em grupo controle (C, n=6, amamentados por mães recebendo dieta normoprotéica) ou desnutrido (D, n=12, dieta hipoprotéica: 8%). O peso dos animais foi aferido diariamente. À idade de desmame, 21 dias, foram observados num campo aberto circular (Ø 1m), delimitado e monitorado por um sistema composto por câmera CCD, placa de aquisição de vídeo, microcomputador de software dedicado às tarefas de aquisição de vídeo. Através de técnicas de processamento digital de imagens, são extraídas do vídeo as posições assumidas pelo rato no campo aberto, traçando a trajetória percorrida durante o período de observação e para calcular a velocidade média, distância percorrida e a potência. Para análise dos dados na comparação entre C e D, utilizou-se o teste "t" de Student (*=p<0,05). Houve redução do peso no grupo D (C= 53,2g ± 2,22; D= 19,4g ± 1,24; p <0,001). Não houve diferença entre os grupos quanto à velocidade média (C= 0,07m/s ± 0,02; D= 0,07m/s ± 0,02; p=0,808) e à distância percorrida (C=9,0m ± 2,87; D=8,7m ± 3,28; p=0,843). A potência (mW) foi menor no grupo D (C= 0,54 mW ± 0,24; D= 0,16 mW ± 0,10; p <0,001).

Conclusões:

A redução da força muscular é dado já demonstrado em outros estudos (Arch Phys Bioch, 112:154, 2004), e reforça o presente achado sobre a redução da potência nos desnutridos. O estudo prossegue para obter maior número de animais por grupo, para confirmação dos dados sobre outros parâmetros

Apoio Financeiro: CNPq ,CAPES

4360 We-Th, no. 63 (P57)

Structure-functional patterns for skeletal musclesV.B. Kokshenev. *Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

Muscles generally act as motors, breaks, struts, and springs [1]. These muscle labor patterns challenge the old problem in functional morphology on evolutionary change in biological form with mechanical functions. We propose a simplified model for the activated skeletal muscle, formed by fast fibers, as the main functional units attributed to its high-efficient mechanical activity. The problem on the structure-functional relations is formulated in terms of the two free parameters, which are the muscle allometry exponents of cross-sectional area and length. The first muscle-growth constraint is known equation for muscle volume. The second one matches various elastic forces, controlled by muscle size and maximal loading, with the motor force, generated by the same muscle. The couple of the shape-force constraint equations is solved and the model domain of muscle activity is established via the four biomechanically adapted functions— shorten, stretch, strut, and spring — associated with the efficient isotonic, eccentric, isometric, and "economic" muscle contractions, respectively. Our analysis of the available from the literature morphometric data on individual muscles in mammalian limbs supports the idea that the muscle's architecture tends to match one of the four primary (high-efficient) mechanical functions, that could be also tested by the muscle work-loop technique [1]. In simple muscle groups, such as the distal group in mammalian leg, synergistic effects of individual muscles predominate. In contrast, complex groups show mixed behavior, which often does not coincide with the individual-muscle function. The primary function of a complex group, formed by agonist muscles recruited for multi-functional tasks, is shown to be the spring function. This activity is examined through the averaged allometric exponents and these for muscle forces, known in joints in fast running animals. As a result, mammalian limbs can be mechanically interpreted as a muscle-springing bone-lever system, biomechanically adjusted with the body-weight independent elastic muscle stress. Financial support by CNPq is acknowledged.

References

- [1] M.H. Dickinson, et al. How animals move: An integrative view, *Science* 2000; 288: 100.

7245 We-Th, no. 64 (P57)
Mechanical properties in young and adult rat muscles submitted to neonatal undernutritionA.E. Toscano^{1,2}, K.M. Barros^{1,2}, F. Goubel¹, R. Manhaes-de-Castro², F. Canon¹. *¹UMR CNRS 6600, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, ²Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil*

Many changes in muscle properties occur during the first month of life. During this period, many aggressions among which undernutrition could alter muscle characteristics such as structure, protein turnover, fibre type proportion or contractile performance. The aim of this study was to evaluate the effect of undernutrition during the critical period of development on contractile and series elastic properties in rat soleus and EDL muscles. In order to test the short- and long-term effects of this early aggression, properties were studied in weaning and adult rats.

Mothers were fed during lactation with a 8% protein diet or a 18% protein diet. At 25 and 90 days of age, muscles of male Wistar rats were excised and placed in an ergometer. Dual controlled releases were used to test contractile and series elastic component (SEC) properties. Tension/extension curves were constructed to assess SEC characteristics. Maximal shortening velocity was calculated from force-velocity curves.

The undernutrition-induced muscle atrophy was more important in young than in adult rats. Results showed a decrease in tetanic tension in the same extent than in muscle weight reduction in undernourished rats. Undernutrition led to an important increase in Vmax only in young rat soleus and EDL muscles, no difference in this contractile characteristic being observed in adults. Analysis of tension/extension curves did not show significant modification in SEC characteristics, except for the maximal extension in young and adult rat soleus. The increase in Vmax observed in young rats may be ascribable to a slowing in the natural process of fast to slow fibre transition during the neonatal development. Limited modification in SEC properties in young rats despite the large increase in Vmax should indicate opposite changes in its active (i.e. cross-bridges) and passive (i.e. tendon) parts.

It was concluded that modifications in some mechanical properties is probably due to an alteration in the events of the maturation process during the neonatal development, and finally, that some of these changes could be partially or totally abolished.

2.7 Musculoskeletal Modelling Meets Muscle Physiology5847 We-Th, no. 68
Self stable basins of attraction of a human arm model: analysis on Lyapunov functions constructed through radial basis functionsM. Ernst¹, P. Giesl², H. Wagner¹, R. Blickhan¹. *¹Science of Motion, Institute of Sport Science, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany, ²Zentrum Mathematik, TU München, Munich, Germany*

Different studies suggest that for musculo-skeletal systems self stability based on mechanical properties without neural feedback plays an important role in animal and human motion [1-3, 5]. In these investigations, however, mostly the stability of equilibria was analysed, but it is an important issue to quantify the basins of attraction for equilibria or trajectories. They give an impression of the quality of the self stable mechanism, whether the basin of attraction of these stable equilibria is large enough to be biologically relevant. It has been shown that Lyapunov functions constructed via radial basis functions give us an instrument to estimate these basins. We used an elbow model consisting of a pair of Hill-type flexor and extensor muscles and estimated the basins of attraction for stable fixed points in different situations, i.e. different elbow angles, activations and loads. The analysis of the model showed that with increasing load the basins of attraction shrink down to a point where the equilibrium became unstable. Contrary a rising basin of attraction was seen for increasing activation of the extensor muscle indicating an increased muscular co-activation. We were able to successfully apply radial basis functions to approximate the basins of attraction of a biomechanical arm model. The results of our study suggest that the basins of attraction of a human arm can achieve really large asymptotically stable areas, i.e. the system would be able to resist relatively strong perturbations. These results underline the potential of the importance of self stability for the control of animal and human motion.

References

- [1] Blickhan R., et al. Recent Research Developments in Biomechanics. Pandalar. Trivandrum, India, Transworldresearch. 2003; 1: 215-245.
[2] Dickinson M. H., et al. *Science* 2000; 288(5463): 100-6.
[3] Giesl P., et al. *J Theor Biol.* 2004; 228: 115-125.
[4] Giesl P. Habilitation thesis, TU München, 2005.
[5] H. Wagner and R. Blickhan. *J Theor Biol.* 1999; 199(2): 163-79.

5474 We-Th, no. 69
A simple motor model represents most of the shortening characteristics of skeletal muscleM. Saito¹, Y. Tamura², A. Ito¹. *¹Department of Electronics and Information Engineering, Suzuka National College of Technology, Suzuka, Japan, ²Department of Physics, Suzuka National College of Technology, Suzuka, Japan*

An appropriate motor model of skeletal muscle is still the focus of research for medical and engineering uses. We proposed previously a motor model had six visco-elastic elements and a contractile component [1,2]. This model represented the major mechanical properties of the muscle well, but was rather complicated for practical use. In this study, therefore, we reduced the number of elements to make a simplified motor model having four visco-elastic elements (one Maxwell- and one Voigt element connected in parallel with each other) besides a force generator. The model is the same as the previous model except for the number of the elements. Using this simplified model, we can represent the isotonic shortening properties of skeletal muscle well. The force-velocity and velocity-length relations and the energy liberation of the previous model could. The slow-stretch/release characteristics (the enhancement/depression properties) are also represented well. The behavior measured by the mechanical vibration method is almost the same as that of the previous model when the frequency of vibration is high. Regarding the isometric contraction, the minimum force T1 and the minimum length change almost disappears in this model, but the slow release behavior remains. Thus the simplified motor model proposed here satisfies most of the important functions of skeletal muscle, and is applicable to medical and engineering purposes.

References

- [1] Tamura Y. and Saito M., *J. Biomechanics* 2002; 35: 1273-1277.
[2] Tamura Y., Saito M. and Nagato R., *J. Biomechanics* 2005; 38: 87-91.

A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats.

- [Barros KM](#),
- [Manhaes-De-Castro R](#),
- [Lopes-De-Souza S](#),
- [Matos RJ](#),
- [Deiro TC](#),
- [Cabral-Filho JE](#),
- [Canon F](#).

Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

The aim of this study was to investigate the effects of malnutrition, induced by a regional basic diet (RBD), on motor development. RBD is a 7.87%-protein diet based on aliments typical of Northeastern Brazil, elaborated after nutritional investigation by Teodosio et al. (1979). Female rats were treated with RBD during lactation. The reflex ontogenesis and the development of locomotor activity in their offspring were assessed. Malnourished (MN) rats showed a delay in reflex maturation and in locomotor activity evolution. The decreased locomotor activity may be related to the reduced movement experiences induced by the delay in the reflex maturation. Occurring during the critical period of brain development, this fact could jeopardize all the steps in future locomotion evolution. The present results confirm deleterious effects of RBD-induced malnutrition on the somatic development and maturation of the nervous system (NS).

PMID: 16910175 [PubMed - indexed for MEDLINE]

A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats

KARLA M. F. T. BARROS^{1,2}, RAUL MANHÃES-DE-CASTRO¹, SANDRA LOPES-DE-SOUZA³, RHOWENA J. B. MATOS⁴, TEREZA C. B. J. DEIRÓ^{1,5}, JOSÉ E. CABRAL-FILHO⁶, & FRANCIS CANON⁷

¹Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, ²Department of Physiotherapy, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, ³Department of Anatomy, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, ⁴Department of Physiology, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁵Department of Nutrition, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, ⁶Instituto Materno-Infantil de Pernambuco, Recife, Brazil, and ⁷UMR6600—Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France

Q2

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of malnutrition, induced by a regional basic diet (RBD), on motor development. RBD is a 7.87%-protein diet based on aliments typical of Northeastern Brazil. Female rats were treated with RBD during lactation. The reflex ontogenesis and the development of locomotor activity in their offspring were assessed. Malnourished (MN) rats showed a delay in reflex maturation and in locomotor activity evolution. The decreased locomotor activity may be related to the reduced movement experiences induced by the delay in the reflex maturation. Occurring during the critical period of brain development, this fact could jeopardize all the steps in future locomotion evolution. The present results confirm deleterious effects of RBD-induced malnutrition on the somatic development and maturation of the nervous system (NS).

Keywords: *Locomotion, malnutrition, rats, reflex-ontogeny*

Introduction

An adequate supply of nutrients is critical for maintenance of growth, as well as, for the development of functions in all organic systems (Morgane et al. 1978; Paixão et al. 2001; Umata et al. 2003). As a consequence, malnutrition is a very important, non-genetic factor affecting the developmental processes (Morgane et al. 1978, 1993). In the nervous system (NS), the sequence of cellular events during the early period of life, embryogenesis and nursing, determine both the definitive neurochemical composition and the morphofunctional structure of the mature organism (Morgane et al. 1978). During this period, the high speed of cellular events induces a higher vulnerability in NS, so that distress acting upon it

could modify the structure and functions in age-related, developmental processes, such as reflex-ontogeny and motor responses (Noback and Eisemann 1981).

The increased NS vulnerability during this early time, and the possibility of permanent repercussions on NS functions arising from adversities, support that this is a “critical period for the NS development”, or “brain growth spurt period” (Dobbing 1970). If malnutrition occurs in this period, the normal cellular events can be altered, with deleterious consequences for development and acquisition of mature, physiological patterns (Nagy et al. 1977; Morgane et al. 1993; Salas et al. 1998; Otellin et al. 2002). In rats, most events related to the critical period of development occur during the first 21

Correspondence: R. Manhães de Castro, Departamento de Nutrição, Laboratório de Fisiologia da Nutrição, CCS-Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária 50670-901, Recife, PE, Brasil. Fax: 55 81 21 26 84 73. E-mail: rcastro@nutricao.ufpe.br

Table I. Centesimal composition of regional basic diet (RBD).

Diets	Ingredients	g (%)	Centesimal composition							
			Protein	Carbohydrates	Fats	Ash	Fibers	Water-soluble vitamins	Fat-soluble vitamins	kcal/%
RBD	Beans*	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*	3.74	2.74	—	0.06	0.06	—	—	—	11.50
	Dried and salted meat fat*	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

* Cooked in water and dried.

postnatal days, which corresponds to the nursing period (Morgane et al. 1978; Dubovický et al. 1996). Several studies reporting on the effects of early malnutrition in rats have shown a developmental delay of motor and neuro-behavioral patterns (Medeiros et al. 2001; Barreto-Medeiros et al. 2002, 2004; Morgane et al. 2002).

It is well known that early malnutrition causes a negative influence on child development (Benitez-Bribiesca et al. 1999; Drewett et al. 2001), including disturbance in the evolution of motor behavior (Bhatia et al. 1979; Benefice et al. 1999; Barros et al. 2003). In order to study the effects of nutritional stress on development, several methods to induce malnutrition have been proposed. Most of them use diet models based on high-quality protein (casein) offered in restricted amounts (Morgane et al. 1978; Segura et al. 2001). However, low-quality protein diets offered *ad libitum* have also been administered (Barreto-Medeiros et al. 2002).

In spite of a decreasing prevalence of malnutrition in children, this is still an important public health problem in developing countries, including Brazil. Northern and Northeastern Brazil are specially affected (Eickmann et al. 2003). In order to conduct an experimental study of the biological consequences of malnutrition, observed in populations of North-eastern Brazil, Teodósio et al. (1990) developed a diet model, the so-called regional basic diet (RBD), which reproduces a pattern of malnutrition in rats, similar to that observed in undernourished children of this region. Therefore, the comprehension of physiological damage, due to malnutrition in these populations, could be analyzed (Teodósio et al. 1979).

The main goal of this study was to investigate the possible influence of malnutrition, induced by RBD, on reflex ontogenesis and on the acquisition of locomotor activity in rats.

Material and methods

Animals

Wistar male rats, from the Nutrition Department of the Federal University of Pernambuco, Brazil, were used. The animals were maintained at a room temperature of 23 ± 2°C, and a 12/12 h light–dark cycle (lights on from 6 am to 6 pm). After mating and once gestation was confirmed, females were housed individually in polypropilene cages, with free access to water and to a standard diet (Labina®—Purina of Brazil), containing 23% protein. Twenty-four hours after birth, pups that were born in the same date, from different mothers, were randomly distributed in litters of six by one dam. The pups were accessed from each reconstituted (randomized) litter, in order to prevent inbreeding. Pups were breastfed throughout the first

21 postnatal days (suckling period). After weaning, they were fed the standard diet.

Nutritional manipulation

The nutritional groups were designed according to the diet received by the mother during lactation. The well-nourished group (WN), whose mothers (*n* = 3) were fed the standard diet, and the malnourished group (MN), whose mothers (*n* = 4) were fed the RBD postpartum. Both diets were offered *ad libitum*. The chemical composition of RBD is outlined in Table I. This diet is constituted of a low-protein amount (7.87%), a low-fat content and is also deficient in vitamins and minerals (Teodósio et al. 1979). Concerning the total number of pups, two female pups were used to complete a six-pups-litter in the WN group; in the MN group, four females were kept to complete two of the litters. All these females were discarded, that is, not used in the experimental procedures.

Procedures

Body weight was measured daily, from the first day (the date of birth was considered day 0) until the 21st day of life, and then again, on the 30th and 60th days. The evaluation of reflex maturation was recorded daily, from day 1 to 21. According to the procedures described in Table II, the following reflexes were examined: palm grasp (PG), righting (R), vibrissa placing (VP), cliff avoidance (CA), negative geotaxis

(NG), startle reflex (RS) and free-fall righting (FR). Reflex maturation was measured by registration of the age (days after birth) in which the reflex was expressed for the first time. An exception was the PG, to which it was recorded the day of disappearance as a sign of maturation. Following each daily reflex test, the locomotor activity was measured by using an open field apparatus. This consisted of a square wood platform, measuring 56 × 56 cm, enclosed by a 15 cm high wall. The floor was divided into 64 squares (7 cm × 7 cm each). At the beginning of each evaluation, the animal was placed exactly in the center of the apparatus. For 1 min, the number of invaded squares (NIS) was registered. One invaded square was counted when the animal's body, including all four paws, was totally inside the referred square. Statistical analyses were performed as follows: after preliminary testing to identify normal distributions (Kolmogorov–Smirnov test) and variance homogeneity (Levine's test), two-tailed Student *t* test (body weight), Mann Whitney “*U*” test (reflexes) and two-way ANOVA, for repeated measures, were used. Tukey test was applied for multiple comparisons. The null hypothesis was rejected when *p* ≤ 0.05.

Results

Body weight

Compared to the control group, the MN group presented a reduction of body-weight gain in the 2nd day (*p* ≤ 0.05) and from the 3rd to the 21st days of life (*p* ≤ 0.01) (Figure 1A). A reduction was also seen on

Table II. Procedures on reflex testing.

Reflex	Stimulus	Response
Palm grasping (PG)	Palm of forepaw stroked gently with a paper clip	Flexion of digits. As mature response, any or a very slight flexion must be seen. The date of disappearance is registered
Righting (R)	Rat placed on back on a flat surface	It turns over, to rest in ventral decubitus, with the four paws on the surface, in 10 s
Vibrissa placing (VP)	Rat held by the tail, head facing an edge of bench, vibrissa just touching vertical surface	Lifts head and extends forepaws in direction of the bench, making oriented “walking” movements to go far from the edge, in 10 s
Cliff avoidance (CA)	Rat put on edge of bench, with nose and forefeet just over edge	Withdrawal of head and both forefeet from edge, moving away from “cliff”, in 10 s
Auditory startle (AD)	Sudden sound stimulus by percussion with a metallic stick in a metal surface	Body retraction, with a transitory immobility. The stimulus was given twice in each test, with an interval of 1 min
Negative geotaxis (NG)	Rat placed with head downwards, on a 45° slope	Turns to face up the slope, at least 130°, in 10 s
Free-fall righting (FR)	Rat held by the paws, back downwards, is dropped from 30 cm on a cotton wool pad	Turns body in mid-air, to land on all fours. All legs must be free of body on landing

(according to Smart and Dobbing 1971).

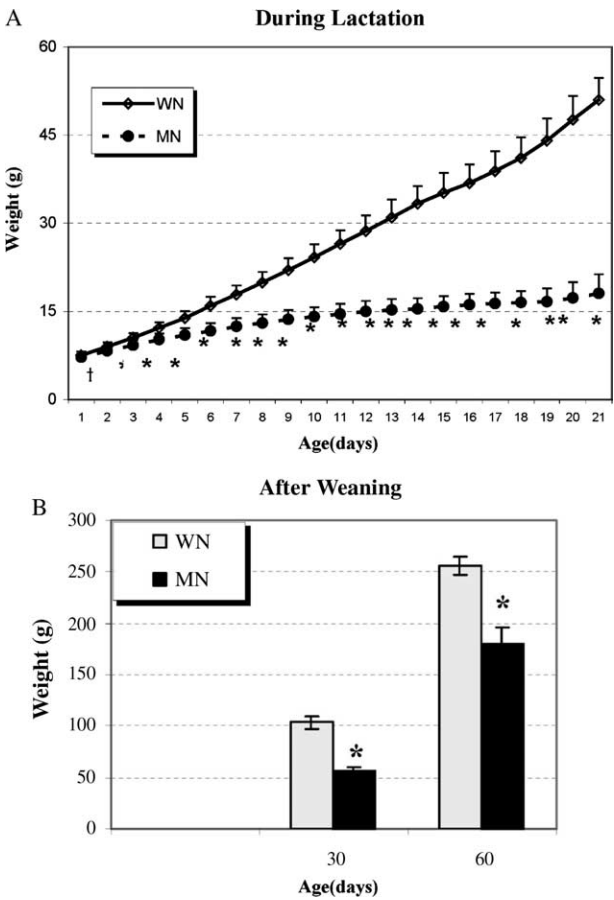


Figure 1. 1A and 1B: Effects of RBD-induced malnutrition on the weight gain. Rats were malnourished (M, $n = 20$, fed by mothers receiving RBD—7.87% protein) or not ($N = 15$, fed by mothers receiving lab chow—22% protein). Weight was measured daily with a digital balance, from 1st to 21st and on the 30th and 60th postnatal days. Values expressed in mean and SE. Statistical analyses made by Student's t test. + $p \leq 0.05$; * $p \leq 0.01$.

the 30th ($p \leq 0.01$) and 60th ($p \leq 0.01$) days (Figure 1B).

Reflex maturation

The MN group showed a retardation in the following reflexes: VP ($p \leq 0.01$); CA ($p \leq 0.01$); NG ($p \leq 0.05$); startle response ($p \leq 0.01$) and FR ($p \leq 0.01$) (Table III).

Development of locomotor activity

Regarding motor activity, ANOVA indicated the main effects for each day of life ($p \leq 0.001$) and for the diet ($p = 0.008$), but there was no interaction between these factors. Both the MN and the WN groups presented a higher NIS on day 21 than on day 14 ($p \leq 0.05$) and than on day 7 of life ($p \leq 0.05$). Compared to the control group, the MN rats showed a reduced NIS on the 21st day ($p \leq 0.05$) (Table IV).

Discussion

Our results showed that neonatal malnutrition induces deficiencies in the body weight, retardation in reflex maturation and delays in the acquisition of mature developmental patterns of locomotor activity. The effects of early malnutrition on the body weight and somatic growth are well-established (Morgane et al. 1978, 1993). This study corroborates previous experimental evidence showing a reduction in body weight of animals submitted to malnutrition during the suckling period (Smart and Dobbing 1971; Johnson et al. 1991). In the present study, a reduction of body-weight gain was observed two days following the introduction of the experimental diet. The use of a multi-deficient diet, directly following labor, along with the depletion of maternal reserves and the high-energy expense of labor (Quek and Trayhurn 1990), induces a deficient nutritional status. Sturman et al. (1986) observed a reduction of protein relative to the amount, in the milk of MN, lactating, female rats. Marín et al. (1995) observed, in MN, lactating rats, a decrease in the size of the mammary glands and small quantities of milk, suggesting a low quality and a reduction in the secreted milk. On the other hand, the perinatal period is also seen as a stressing time for the neonate, since thermal and alimentary adaptations are happening, with considerable energy expense (Boxwell et al. 1995).

The reflex-maturation pattern, “a behavior elicited by exactly prescribed stimulation” (Smart and Dobbing 1971), is currently used to demonstrate an appropriate maturation of CNS, during development. Fox (1965) reported a well-defined pattern of reflex maturation in the rat, providing an important tool

Table III. Effects of RBD-induced malnutrition on reflex ontogenesis.

Groups	Reflex						
	Palm grasp (PG)	Righting (R)	Vibrissa placing (VP)	Cliff avoidance (CA)	Negative geotaxis (NG)	Startle response	Free-fall righting (FR)
WN ($n = 16$)	6 (5–8)	6 (3–8)	12 (9–14)	13 (12–15)	14 (12–16)	12 (11–13)	14 (11–17)
MN ($n = 20$)	5 (3–8)	5 (3–9)	15 (10–16)*	15 (10–19)*	16 (10–19)*	13 (10–16)*	16 (15–20)*

Reflex ontogenesis was evaluated daily, from 1st to 21st postnatal days. Values are expressed by median (minimum and maximum values in parenthesis) representing the age (days after birth) of reflex maturation. Statistical analysis was made by Mann–Whitney “U” test. * $p \leq 0.05$.

Table IV. Effects of RBD-induced malnutrition on the locomotor activity evolution.

Groups	Age (days)		
	D7	D14	D21
WN	1.06 ± 0.15 ^a	13.24 ± 1.14 ^b	54.68 ± 2.80 ^c
MN	1.13 ± 0.15 ^a	8.49 ± 0.68 ^b	44.54 ± 3.08 ^d

The number of invaded squares (NIS) in the open field was recorded in the 7th, 14th and 21st postnatal days, by observing during 1 min the animal's spontaneous movement. Comparisons by two-way ANOVA for repeated measures followed by Tukey test. Main effects: diet, $F = 7.95$ ($p = 0.008$); day $F = 324.22$ ($p < 0.001$); interaction diet vs. day, $F = 2.90$ ($p = 0.062$). Distinct letters indicate significantly different means ($p \leq 0.05$).

for development evaluation. Using this model, Smart and Dobbing (1971) demonstrated a delay in the maturation of reflexes, caused by prenatal or postnatal malnutrition in rats. So, in the present study a similar delay of reflex development could be associated with the RDB-induced malnutrition.

Thus, locomotion patterns in the rat, which develops according to a chronological sequence, and depend on posture and gravity, as well as, the integrity of the motor system (CNS–muscle–skeletal) (Fox 1965; Walton et al. 1992; Gramsbergen 1998), can suffer alterations due to interference of nutritional adversities.

By using a model of maternal, neonatal malnutrition, Salas et al. (1998) observed decreased growth of the pups, as well as, a reduction in behavioral attitudes that represent maternal care and stimulation (Salas et al. 1998). Furthermore, the authors showed an increase in the time spent by the young animals in self-grooming, what indicates a reduced social interaction, or a reduction of motivation on the part of the mothers. Such behaviors, during this early phase of life, play an important role in the initiation of several abilities, including voluntary movements. Therefore, the diminution of locomotor activity, observed in our study, could have been attributed to the reduction in behavioral interaction between the suckling and its environment. Malnutrition has also been associated with an alteration in the emotional and behavioral changes in rat pups (Sobotka et al. 1974; Teodósio et al. 1979). The latter described an increase in freezing-like responses to fear situations, and a delay in the learning of avoidance responses.

It is noteworthy that in humans, long-term consequences of malnutrition can be disastrous for physical and cognitive evolution, as seen in follow-up studies of MN children (Dobbing 1970; Gosselin et al. 2002; Umeta et al. 2003).

The reduced locomotor activity of RDB animals, caused by malnutrition, as this study suggests, is in agreement with the findings of Smart and Dobbing (1971). These authors observed an increase in

rotation motions, thus influencing the development of organized movement patterns in a negative way. Nagy et al. (1977) presented similar results, associating this “behavioral agitation” to a lack of inhibition of the locomotor behavior. This kind of inhibition would characterize a functional immaturity of locomotion in the adult life. Lynch et al. (1975) also suggested that the differences observed in the motor performance of MN rats could result in an alteration in the organism's attentiveness. These authors pointed out a relationship between the decrease of cerebral growth and the changes in movement patterns of MN rats. On the other hand, a delay in axonal myelination, attributed to malnutrition, as observed by Noback and Eisenman (1981), is suggested to be a possible cause of this growth retardation. As a matter of fact, a study using more refined parameters to the evaluation of locomotor-activity, also seeking for malnutrition-induced anatomical alterations, would provide more effective conclusions.

In the present study, the decrease in locomotor activity might be related to slow, somatic growth and to the delay of reflex maturation, since the impairment of these processes is capable of reducing the experiences of movement. Moreover, when occurring during the critical period of locomotion development, all the steps for future locomotor evolution could be jeopardized (Walton et al. 1992).

The RDB, as a diet model to induce malnutrition, has a deleterious effect on the somatic development and the maturation of NS. These findings must be taken into account, when thinking about regional, alimentary patterns, and the prevention of health problems in populations exposed to malnutrition.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES (project CAPES–COFECUB). The authors are grateful to Professor MSc Mary Therese Vitlow and Professor Claudia Louback, for critical reading and English review of the manuscript.

References

- Barreto-Medeiros JM, Cabral-Filho JE, Souza SL, Freitas-Silva SR, Mendes-da-Silva C, Deiró TCBJ, Monteiro JS, Guedes RCA, de Castro CMM, Manhães-de-Castro R. 2002. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. *Nutr Neurosci* 5:211–214.
- Barreto-Medeiros J, Feitoza EG, Magalhães K, Cabral-Filho JE, Manhães-de-Castro FM, de-Castro CM, Manhães-de-Castro R. 2004. Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. *Nutr Neurosci* 7:49–52.
- Barros KMFT, Câmara-Fragoso AG, Bezerra-de-Oliveira AL, Cabral-Filho JE, Manhães-de-Castro R. 2003. Do environmental influences alter motor abilities acquisition? A comparison

- among children from day-care centers and private schools. *Arq Neuropsiquiatr* 61:170–175.
- Benefice E, Fouere T, Malina RM. 1999. Early nutritional history and motor performance of Senegalese children, 4–6 year of age. *Ann Hum Biol* 26:443–455.
- 555 Benitez-Bribiesca L, de la Rosa-Alvares I, Mansila-Olivares A. 1999. Dendritic spine pathology in infants with severe protein–calorie malnutrition. *Pediatrics* 104:e21.
- Bhatia VP, Katyar GP, Agarwal KN. 1979. Effect of intrauterine nutritional deprivation on neuromotor behavior of the newborn. *Acta Paediatr Scand* 68:561–566.
- 560 Boxwell J, Ayson P, Ramenofsky M. 1995. Growth and metabolic parameters in pups of undernourished lactating rats. *Physiol Behav* 57:469–475.
- Dobbing J. 1970. Undernutrition and the developing brain. *Am J Dis Child* 120:411–415.
- 565 Drewett R, Wolke D, Asefa M, Kaba M, Tessema F. 2001. Malnutrition and mental development: Is there a sensitive period? A nested case-control study. *J Child Psychol Psychiatry* 42:181–187.
- Dubovický M, Ujházy E, Jezová D. 1996. Perinatal brain damage and neurobehavior alterations in postnatal development. *Slovakofarma Revue* 6:46–49.
- 570 Eickmann SH, Lima AC, Guerra MQ, Lima MC, Lira PI, Huttly SR, Ashworth A. 2003. Improved cognitive and motor development in a community-based intervention of psychosocial stimulation in Northeast Brazil. *Dev Med Child Neurol* 45:536–541.
- Fox WM. 1965. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Anim Behav* 13:234–241.
- 575 Gosselin J, Amiel-Tison C, Infante-Rivard C, Fouron C, Fouron JC. 2002. Minor neurological signs and developmental performance in high risk children at preschool age. *Dev Med Child Neurol* 44:323–328.
- Gramsbergen A. 1998. Posture and locomotion in the rat: Independent or interdependent development? *Neurosci Biobehav Rev* 22:547–553.
- 580 Johnson JD, Wogenrich WJ, His KC, Skipper BJ, Greenberg RE. 1991. Growth retardation during the suckling period in expanded litters of rats: Observations of growth patterns and protein turnover. *Growth Dev Aging* 55:263–273.
- 585 Lynch G, Smart JL, Dobbing J. 1975. Motor coordination and cerebellar size in adult rats undernourished in early life. *Brain Res* 83:249–259.
- Marín MC, Tomás ME, Serres C, Mercuri O. 1995. Protein–energy malnutrition during gestation and lactation affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *J Nutr* 125:1017–1024.
- 590 Medeiros JMB, Silva CM, Sougey E, Costa JÁ, Castro CMM, Manhães-de-Castro R. 2001. Action of selective serotonin reuptake inhibitor on aggressive behavior in adult rat submitted to the neonatal malnutrition. *Arq Neuropsiquiatr* 59:499–503.
- 595 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.
- Morgane PJ, Austin-Lafrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 17:91–128.
- Morgane PJ, Mockler DJ, Galler JR. 2002. Effects of perinatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 26:471–483.
- 610 Nagy ZM, Porada KJ, Anderson JA. 1977. Undernutrition by rearing in large litters delays the development of reflexive, locomotor, and memory processes in mice. *J Comp Physiol Psychol* 91:682–696.
- 615 Noback CR, Eisenman LM. 1981. Some effects of protein–energy malnutrition on the developing central nervous system of the rat. *Anat Rec* 201:67–73.
- Otellin VA, Khozhai LI, Gilerovich EG, Korzhevskii DE, Kotskin DE, Belostotskaia GB. 2002. Damaging impacts at the critical time periods of prenatal ontogenesis as a factor modifying the cerebral structural development and postnatal behavior reactions. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk* 12:32–35.
- 620 Paixão ADO, Maciel CR, Teles MBB, Figueiredo-Silva J. 2001. Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphology in adult age. *Biol Neonate* 80:239–246.
- 625 Quek VS, Trayhurn P. 1990. Calorimetric study of the energetics of pregnancy in golden hamsters. *Am J Physiol* 259:807–812.
- Salas M, Frias C, Torrero C, Regalado M, Loranca A. 1998. Swimming and self-grooming development in pups nursed by neonatally underfed rats. *Growth Dev Aging* 62:67–75.
- 630 Segura B, Guadarrama JC, Gutierrez AL, Merchant H, Cintra L, Jiménez I. 2001. Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutr Neurosci* 4:475–488.
- 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 Res* 28:85–95.
- 635 Sobotka TJ, Cook MP, Brodie RE. 1974. Neonatal malnutrition: Neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Res* 65:443–457.
- Sturman JA, Devine E, Resnick O, Morgane PJ. 1986. Maternal protein malnutrition in the rat: Effect on protein and two enzymes in the milk. *Nutr Res* 6:437–442.
- 640 Teodósio NR, Cabral-Filho JE, Guedes RCA, Costa JA, Ramos-Costa FB, Silva AT. 1979. Learned and emotional behavior in chronically malnourished rats. *Acta Physiol Latinoam* 29:255–262.
- Teodósio NR, Lago ES, Romani SAM, Guedes RCA. 1990. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* 45:533–545.
- 645 Umeta M, West CE, Verhoef H, Haidar J, Hautvast JG. 2003. Factors associated with stunting in infants aged 5–11 months in the Dodota–Sire District, rural Ethiopia. *J Nutr* 133:1064–1069.
- 650 Walton KD, Lieberman D, Llinás A, Begin M, Llinás RR. 1992. Identification of a critical period for motor development in neonatal rats. *Neuroscience* 51:163–767.

Running Title:

Differential Adaptations in Rat Muscles ...

**Differential adaptations during brain growth spurt and in
Adult Age in rat muscles.**

Barros KMFT.^{1,2}, Manhaes-de-Castro R.¹; Goubel F.², and Canon F.²

AUTHORS:

Karla Mônica Ferraz Teixeira de BARROS *

Raul MANHÃES-DE-CASTRO

Francis GOUBEL

Francis CANON

¹ Departamento de Nutricao, Centro de Ciencias da Saude, Universidade Federal de
Pernambuco, Av. Moraes Rego 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

Phone (0552181)21268470 / FAX

karlamonica.debarros@utc.fr 

² Département de Génie biologique, UMR CNRS 6600, Université de Technologie de
Compiègne, BP20529, F-60205 Compiègne cedex, France

francis.canon@utc.fr

Key-words : muscle ; biomechanics ; growth ; rat

Abstract

BARROS, K.M.F.T.; MANHAES-DE-CASTRO,R.; GOUBEL, F.;CANON,F. *Differential adaptations during brain growth spurt and in adult age in rat muscles*. During the post weaning growth and maturation period (25/90 days after birth), rat limb muscles are submitted to specific adaptations. Our aim was to characterize the mechanical properties of two muscles that are opposite in terms of fibre type distribution, the soleus and the EDL muscles of male Wistar rats. Results showed a fast to slow fibre type transition in soleus while no modification in fibre type distribution was observed in EDL. A growth-induced increase in muscle force was observed. Soleus underwent an increase in temporal parameters of twitch, but EDL showed no modification. Resistance to fatigue was higher in 90-day-old soleus but not modified in the EDL. Surprisingly, analysis of Vmax showed a decrease in maximal velocity in both soleus and EDL. Lastly, tension/extension curves indicated a growth-induced increase in series elastic stiffness in the two muscles. These results suggest that during this growth period, skeletal muscles are submitted to differential adaptations. Moreover, whereas adaptation of biomechanical properties observed can be explained partly by an adaptation of fibre profile in soleus, this is not the case for EDL. It is suggested that changes in muscle architecture, which are often disregarded, could explain some variations in mechanical properties, especially when muscles undergo an increase in both mass and length.

INTRODUCTION

Motor abilities reflect one of the most important tools in the relationship of a living being and its environment. These abilities begin early in almost all species and it is well known that the development of motor functions is closely related to a normal development of various organic systems. The locomotor system undergoes pronounced changes throughout its lifespan. As a target of this system, skeletal muscle shows exceptional adaptability.

In humans the major events, which define the functional properties of skeletal muscle, proceed until the end of the prenatal period [1]. On the other hand, in rats, these events are prolonged until the end of the neonatal period (21st postnatal day) [2,3]. At this weaning age, almost all functional elements are ready to allow an independent locomotion when the rat pups leave the nest. During the first 3 weeks of life, numerous complex changes in histochemical, biochemical, as well as metabolic properties take place [4]. Fibre differentiation can give a useful example of this complex period. As a matter of fact, skeletal muscle shows a gradual slow and fast fibre differentiation as well as a fast differentiation into IIA and IIB type [5,6]. At weaning age, skeletal muscles have a well-defined, myotypological pattern, in agreement with their functional profile.

However, muscle will still be submitted to some maturation process until adulthood [7,4]. In this post-weaning growth and maturation phase (4-16 weeks), among other things, the muscle continues to grow and mature until the animal reaches sexual maturity [8].

Nevertheless, as judged by modifications of fibre type distribution during growth, changes in slow and fast skeletal muscles seem not to be to the same extent. As a matter of fact, for soleus muscle, numerous authors have reported a relative increase in slow twitch fibre to the detriment of fast twitch after the weaning age [7,9,4]. On the other hand, for fast EDL muscle, the literature indicates variability in the degree of growth-induced change in histochemical properties. It has been reported that the percentage of slow fibres or type I

1 myosin heavy chain (MHC) was unmodified or reduced [9,6,10]. Moreover, when
2 modifications in proportion of fast IIa and IIb fibres or IIa and IIb MHC were reported, these
3 changes were minor and sometimes opposite [4,6,10,11].

4 On the other hand, contractile characteristics of adult rat soleus and EDL muscles have
5 been objects of numerous studies (See for review Close, 1972) [12]. These two muscles,
6 which are different with respect to their fibre type distribution, differ also in their mechanical
7 properties. The most useful mechanical characteristics reported to show this difference is
8 twitch kinetic and maximal shortening velocity (V_{max}). As a matter of fact, V_{max} of EDL
9 muscle is at least twofold higher than in soleus muscle in adult rats [13,14]. The difference in
10 this parameter is closely related to the predominant fibre type present in the muscle. Indeed,
11 in the adult rat, soleus muscle contains about 80 – 85% slow twitch fibre, whereas EDL
12 contains at least 95% fast fibre. Moreover, changes in V_{max} were reported in adult rat
13 muscles using overuse or disuse experiments [15,16,14] and these alterations are generally
14 related to a shift in isomyosin or fibre type distribution [16,17]. However, to our knowledge,
15 changes in mechanical properties during growth (i.e between weaning age and adult age) in
16 soleus as well as in EDL muscles are scarce. Moreover, a possible mechanical site of
17 adaptive response of the skeletal muscle is the series elastic component (SEC). As a matter of
18 fact, SEC includes not only passives structures (i.e. tendon) but also an active part (i.e. cross-
19 bridges) and a link between fibre composition and SEC properties has been proposed [18].
20 Rat studies using training or disuse methods reported contrary modifications in SEC stiffness
21 associated with fibre type transitions [15,16,19]. To our knowledge, there have been no
22 studies reporting the effect of the growth in SEC properties of soleus and EDL muscles.

23 Thus, the objective of this study was to characterize contractile as well as series elastic
24 properties of these two muscles. The characterization of mechanical properties in these two
25 periods can be an important tool to estimate a normal pattern of muscle evolution. By this

way, it would be possible to determine any variations due to aggressions or diseases occurring during this critical period, which could influence the maturation of motor functions. In addition, the significant lengthening of the muscle, which can occur only during the phase of massive growth of the animal, can involve modifications in muscle architecture, thus in mechanical properties. This last point will be taken into account in order to explain some modifications of contractile properties obtained in the present study.

MATERIALS AND METHODS

Animal care and muscle sampling

Sixteen 25- and fourteen 90-day-old male Wistar rats were used in this study. 25-day-old rats will show a freely moving capacity; at 90 days, they've reached sexual maturation, and so are young adults. The animals were maintained at a room temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, and a 12/12 hours light-dark cycle. The protocols used in the present study were approved by the Ethics, Hygiene and Safety Committee of the University of Compiègne. The rats were anaesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (30mg/kg). The soleus and EDL muscles were carefully excised from the hindlimb and placed in a dissection chamber containing a Ringer solution (composition in mM: NaCl, 115; NaHCO_3 , 28; CaCl_2 , 2.5, MgSO_4 , 3.1; KCl, 3.5; KH_2PO_4 , 1.2; glucose, 11.1) maintained at 25°C and oxygenated with a gas mixture of 95% O_2 and 5% CO_2 with resulted in a pH of 7.3. Muscles were either used for mechanical experiment or for histochemical analysis

Experimental setup

Immediately after dissection, the muscle was mounted horizontally in the chamber with its proximal part fixed to a force transducer. Its distal extremity was linked to the moving part

1 of a servo-controlled ergometer described in detail elsewhere [20]. Care was taken to
2 minimize the length of free tendon. Muscles were adjusted to an optimal length (L_0) defined
3 as the length at which maximum twitch tension (P_t) was elicited. Tetanic stimuli of optimal
4 frequency were delivered via two parallel silver electrodes located on either side of the
5 muscle. Pulses were supramaximal, 0.5 ms in duration and of alternate polarity in order to
6 avoid electrolysis. The movement of the ergometer was triggered when the tetanic tension (P_0)
7 was fully developed (800 msec and 400 msec after initiation of the stimulation for soleus and
8 EDL muscles respectively). Each muscle was then submitted to a series of dual controlled
9 releases. At first, a controlled fast release (ΔL) at maximum velocity (30 cm.s^{-1}) was
10 performed in order to let down the series elastic component (SEC). The minimal tension P
11 obtained at the end of this fast release was then measured. Immediately after this fast release,
12 the muscle was shortened at a constant velocity (V) adjusted to obtain a plateau in tension
13 with minimum transients. A 5 min resting period was observed between two tetanii to avoid
14 muscle fatigue.

15 In order to test SEC stiffness, tension/extension curves were constructed by plotting the
16 normalized shortening ($\Delta L/L_0 \cdot 10^{-2}$) against the normalized tension (P/P_0) from 10-15 releases
17 of different amplitudes. The data were fitted to a third-order polynomial function and the
18 muscle stiffness was evaluated by computing the compliance ($\Delta L/\Delta P$) at P_0 and $0.2 P_0$ and the
19 maximal extension ($\Delta L_{\max}$), i.e. the minimal release required to obtain zero tension. The area
20 under the tension/extension curve, which represents the maximal potential energy storable in
21 the SEC, was also calculated.

22 According to Hill's equation $[(P+a)(V+b) = (P_0+a)b]$, a linearization of force/velocity
23 curves was performed by plotting for each isovelocity shortening (V) the normalized steady
24 tension (P/P_0) against the ratio $(P_0-P)/VP_0$. The data were then fitted to a linearized function
25 and the maximal shortening velocity ($V_{\max}$) was computed using regression analysis.

Both tetanic and twitch tension (P_0 and P_t respectively) were measured for each muscle. The twitch kinetics were analysed by the measurements of contraction time (CT) and half relaxation time (HRT).

A fatigue test was performed using a procedure similar to that described by Burke et al (1973) [21]. Briefly, pulses (frequency : 40 Hz ; duration : 330 ms) were delivered once per second for 2 minutes. Resistance to fatigue was quantified by measuring tension production every 5 seconds. The endurance index (expressed as a percentage) was calculated as the tension produced every 30 seconds divided by the tension produced during the first second.

Histochemical analysis

Muscles were excised and frozen in liquid nitrogen until they were examined. Serial cross sections (10 μ m) were cut with a cryostat maintained at -20°C and were stained for Calcium-activated myofibrillar ATPase (mATPase) after preincubation at various pH levels. Muscle fibres were classified on the basis of differences in staining intensity for mATPase after alkaline (pH 10.3) or acid (pH 4.3 ad 4.6) preincubation [22]. Since a detailed histochemical analysis was beyond the scope of the present paper, muscle fibres were classified into three major types (I, IIa and IIb) and intermediate type fibres (Int) [23]. Histochemical analysis was performed using the QWin Leica® image analysis system. The muscle fibre type composition was determined by counting approximately 1000 fibres in fields equally distributed over the sample.

Statistical analysis

All data shown are presented as mean $\pm$ SE. All statistical analyses were performed using a computer program (Statgraphics plus 5.0). A two-way variance analysis was performed to evaluate the influence of age or muscle type. If an overall significant P-value

was obtained, a Fisher's post hoc analysis was used to isolate the significantly different means. All comparisons were performed at a 95% confidence level.

RESULTS

Body and muscle weights

The weight of the 90-day-old rats was roughly 4 times higher than that of the 25-day-old rats (95.2 ± 2.4 g in 25-day-old rats compared to 460.1 ± 14.6 g in 90-day-old rats, $p < 0.05$). This body weight increase was accompanied by an increase in both soleus (63.3 ± 1.5 mg vs 232.1 ± 7.1 mg, $p < 0.05$) and EDL muscles wet weight (50.9 ± 1.6 mg vs 240.9 ± 6.9 mg, $p < 0.05$).

Force and twitch characteristics

As shown in Table I, both twitch and tetanic tension of soleus and EDL muscle were significantly higher in 90-day-old rats than in 25-day-old animals. When tetanic tension was normalized with respect to muscle mass, results indicated an increase in relative tension only for EDL muscle. When a comparison was made between soleus and EDL muscles for the same age, data showed a greater twitch and tetanic absolute tension in EDL muscle and twice the relative tension in this muscle.

Whereas for the soleus muscle, both CT and HRT were significantly increased in 90-day-old rats in comparison with the 25-day-old rats, these values were not different for EDL muscle.

Maximal shortening velocity

V_{max} of both soleus and EDL muscles had significantly decreased with age (figure 1). For these two muscles, the growth resulted in a 20% and 22% decrease in maximal velocity in soleus and EDL muscles, respectively. On the other hand, EDL muscle showed a significantly faster maximal shortening velocity than soleus muscle in the two age groups. In effect, whatever the age, V_{max} in EDL muscle was approximately 2.5 fold higher than in soleus muscle for the same age.

Series Elastic properties

As shown in Figure 2, the tension/extension curves established for both soleus and EDL muscles present the classical non-linear shape, showing a decrease in stiffness when tension fell. Moreover, soleus and EDL muscles in 90-day-old rats were found to be significantly stiffer than those of the 25-day-old rats. Indeed, the growth-induced increase in SEC stiffness was confirmed by the calculation of the normalized compliance at $0.2P_0$ and by the fact that the maximal extension was smaller in the 90-day-old muscles than in the 25-day-old muscles (Table II). Moreover, the decrease of the area under the tension/extension curve exhibited by the 90-day-old soleus muscle attested to this increase in SEC stiffness. On the other hand, whatever the age, EDL muscle was found to be less stiff than soleus muscle.

Fatigue characteristics

As shown in Table III, there was no age effect in endurance index for EDL muscle. On the other hand, for soleus muscle, the endurance index was higher after the 30th second in the 90-day old rats compared to the data obtained in the 25-day-old rats. Moreover, important differences between soleus and EDL muscles can be observed. Indeed, EDL muscle was globally more fatigable than soleus muscle, and this difference in endurance index was particularly pronounced after the first minute (Table III).

Histochemistry

As shown in Figure 3, there was a fast to slow transition in soleus muscle during growth. As a matter of fact, the percentage of fibre type I rose about 50%, essentially to the detriment of type IIa fibres. On the other hand, for EDL muscle, there was no difference in fibre type distribution between 25-day and 90-day-old rats.

DISCUSSION

As in most studies regarding age effects, the present results indicate a fast-to-slow transition in soleus muscle, whereas no modification in fibre type distribution is observed in EDL muscle [7,9,6,10,4].

On the other hand, as expected, the growth-related increase in rat body weight was accompanied by an increase in soleus and EDL muscles weight. In the same sense, our results indicate increases in both twitch and tetanic forces in soleus and EDL muscles. Nevertheless, whereas relative tetanic tension was not modified in soleus muscle, 90-day-old EDL muscle developed a greater P_0/MW than 25-day-old EDL. Muscle tension development depends on contractile material operating in parallel within the muscle and the tension was generally normalized with respect to physiological cross sectional area (PCSA) since PCSA and maximum force are proportional [24]. PCSA, which represent cross sectional area of muscle according to perpendicular axis of fibres, is calculated by the following equation $MW/(L_0 * Lf/L_0 * 1.06)$ were Lf/L_0 is the ratio between fibre length and muscle length, and 1.06 is density of skeletal muscle [25]. Nevertheless, between 25 and 90 days of age, muscles undergo important increases in both muscle weight and muscle length and modification in

1 muscle architecture leading to a change in the L_f/L_0 ratio. It was reported a 18% reduction in
2 L_f/L_0 between 40 and 120 days of age for rat EDL muscle which presents, at adult age, a
3 pennation angle of 10° [26]. For this pennate muscle, the smaller increase in L_f in comparison
4 with L_0 can be due to an increase in pennation angle with age. If this is the case, this
5 phenomenon can explain the increase in relative tetanic tension in this muscle. On the
6 contrary, for an almost parallel-fibered muscle like soleus [13], contributions of changes in
7 muscle architecture can be considered as negligible.

8 Furthermore, whatever the age, soleus muscle exhibited a smaller relative tetanic force
9 than EDL muscle. These differences in maximum tension between fast and slow muscles
10 were well documented [12]. For example, a lesser force was developed per unit of cross-
11 sectional area in slow fibres than in fast fibres [27]. In this view, the differences in tension
12 observed between soleus and EDL muscles may be related to the difference in the principal
13 fibre type present in this two muscles, i.e. slow fibre type in soleus muscle and fast fibre type
14 in EDL muscle, even if extrinsic factors influence tension production [12] like muscle
15 architecture.

16 Twitch contraction time as well as half relaxation time were increased in 90 day-old
17 soleus muscle, compared to 25 day-old. On the other hand, no difference was seen in the EDL.
18 It is generally assumed that these parameters reflect both the rate of cross-bridges cycling and
19 the calcium kinetics for uptake and reuptake into the sarcoplasmic reticulum [12] and
20 consequently, depend on fibre type distribution in muscle. In this way, the fast to slow
21 transition in soleus muscle as well as the unmodified fibre type distribution in EDL muscle
22 are in accordance with results of twitch kinetics observed in this study. Moreover, the form of
23 the isometric twitch depends on the mechanical properties of the SEC [28,29] and
24 modifications of these elastic properties could modify the parameters derived from the twitch.
25 As a matter of fact, since a growth-induced increase in SEC stiffness in soleus muscle was

also found, this may shorten the twitch and so, take part in the reduction of the twitch kinetic parameters in this muscle. Differences in twitch kinetics reported in this study between fast EDL and slow soleus muscles were in accordance with the literature for adult rats [31,30] and were related to the different fibre type distribution between these muscles.

Resistance to fatigue was more pronounced in adult soleus muscle in comparison to weaning age even though no difference was observed for EDL muscle. Moreover, for 25 and 90-day old rats, soleus muscle presented a greater resistance to fatigue than EDL muscle. These differences in fatigability are in accordance with the histochemical profile of these muscles. As a matter of fact it is generally assumed that type I fibre has a greater resistance to fatigue than type IIa fibre, this last fibre type being less fatigable than type IIb fibre[21]. In our study, it was noted that there was a large rise in type I fibre proportion with a concomitant drop of type IIa fibre in soleus muscle. This explains the 20% increase in endurance index from weaning to adult age.

Analysis of Vmax showed a decrease in this parameter in both soleus and EDL muscles during growth. Vmax is thought to be largely dependent of myosin ATPase but also is a function of the pennation angle and of a number of sarcomeres operating in series in the muscle. Since during growth, there was an important increase in muscle length due in part to an increase in fibre length, and thus, in the number of sarcomeres in series, it seems interesting to estimate the shortening velocity in terms of unit amounts of contractile material operating in series. For this purpose, Vmax for one unit, i.e. for one sarcomere (in mm/s), was calculated from the number of sarcomeres in soleus and EDL fibres reported by Close (1964) [13]. For soleus muscle, the calculation reveals a reduction in Vmax per one sarcomere during growth (0.008 ± 0.0005 mm/s vs 0.0064 ± 0.0005 mm/s in 25 and 90-day-old rat respectively, $p < 0.05$). This decrease in Vmax per sarcomere is to the same extent as the 20% decrease in Vmax, expressed in L_0/s . Firstly, this result confirms that the increase in muscle length was

to the same extent as the increase in the number of sarcomeres in series (and consequently in fibre length) in this almost parallel-fibered muscle. Secondly, the decrease in V_{max} observed for this muscle is really a decrease in shortening velocity at the unit level. This decrease in shortening velocity, both in terms of muscle length and in terms of sarcomere unit, is consistent with the fast to slow transition observed in this specific muscle. Indeed, correlation between V_{max} and the percentage of fast myosin heavy chains have been reported at the fibre level [32]. On the other hand, these results indicate that, for the soleus muscle, modifications in muscle architecture with age are negligible. Nevertheless, for EDL muscle, calculation shows no modification in V_{max} per one sarcomere between 25 and 90-day-old rat (0.0239 ± 0.0016 mm/s vs 0.0218 ± 0.0008 mm/s, respectively; NS). The discrepancy in evolutions between V_{max} in L_0/s and V_{max} per sarcomere unit for this muscle confirms a lesser fibre length increase compared to the increase of muscle length as observed in other studies [33]. More importantly, the non-significant modification of V_{max} in terms of sarcomere unit is in agreement with the maintenance of fibre type profile during growth in this muscle. Finally, it is important to note that if skeletal muscle presents a relatively small fibre length to muscle length ratio (between 0.34 and 0.41)[33], then the expression of V_{max} in L_0/s is inappropriate for representing the paired changes in maximal velocity and fibre-type profile when the muscle is submitted to important length changes, such as during growth.

Strikingly, the results of this study indicate an increase in SEC stiffness with age in both the soleus and EDL muscles. These changes could be attributed to the active part (i.e. cross-bridges) and/or the passive part (i.e. tendon) of the SEC. In the first case, methods using either hypo or hyperactivity indicated that an increase in percentage of fast-twitch fibres in the rat soleus muscle was related to an increase in SEC compliance, even though opposite SEC mechanical change was associated with a relative increase in slow-twitch fibre proportion [16, 34,19]. These studies suggest that slow-twitch fibres and fast-twitch fibres also differ

1 according to their elastic properties. Moreover, it was reported that the slow-twitch motor unit
2 of a cat's peroneus longus had a greater dynamic stiffness than fast-twitch motor units [35].
3 Therefore, for soleus muscle, the growth-induced increase in SEC stiffness can be explained
4 at least partly by the fast to slow transition observed for this muscle. However, it is probable
5 that the increase in soleus SEC stiffness is also due to an increase in stiffness of the passive
6 structures of the SEC. Indeed, even if precautions were taken in order to minimize free tendon
7 length, intramuscular tendon tissue occupies about a third of the total soleus length. It was
8 reported that collagen concentration in whole soleus muscle including tendons is twice in the
9 young adult rat as compared to the 21-day-old rats [36]. Thus, one can expect an increase in
10 the passive part of SEC stiffness during growth. For EDL muscle, the growth-induced
11 increase in SEC stiffness can not be explained by a modification of the active part of this
12 muscle component since present studies show no modification in fibre type profile. Therefore,
13 the stiffness modifications observed for EDL muscle are probably due to adaptations of the
14 passive structure of the SEC. Results of other studies showing a growth-induced increase in
15 collagen concentration in whole EDL muscle consolidate this hypothesis [36]. Lastly,
16 possible changes in EDL muscle architecture with growth must be considered. As a matter of
17 fact, for EDL muscle, a part of muscle compliance was due to muscle architecture, i.e. to the
18 degree of pennation [37].

19
20 In conclusion, the results of this study show important modifications on contractile and
21 series elastic properties in skeletal muscle due to growth. Interestingly, modifications in these
22 properties seem not to be totally related to some change in histochemical profile. Concerning
23 SEC properties, the observed increase in stiffness is partly ascribable to changes in passive
24 structures. Concerning contractile properties, the decrease in V_{max} observed in EDL muscle
25 was not accompanied by changes in fibre type distribution. For such a pennate muscle, a

1 discrepancy between histochemical profile and maximal velocity can be removed provided
2 that V_{max} is expressed in terms of velocity of contractile unit. Thus, during the growth when
3 muscle hypertrophy is due to an increase in both cross-sectional area and muscle length,
4 modifications in muscle architecture must be taken into account when expressing muscle
5 mechanical properties.

6
7 Acknowledgements. This work was supported by CAPES (project CAPES-COFECUB). The
8 authors are grateful to Professor MSc Mary Therese Vitlow, for critical reading and english
9 review of the manuscript.

10

1 (Table I)

2

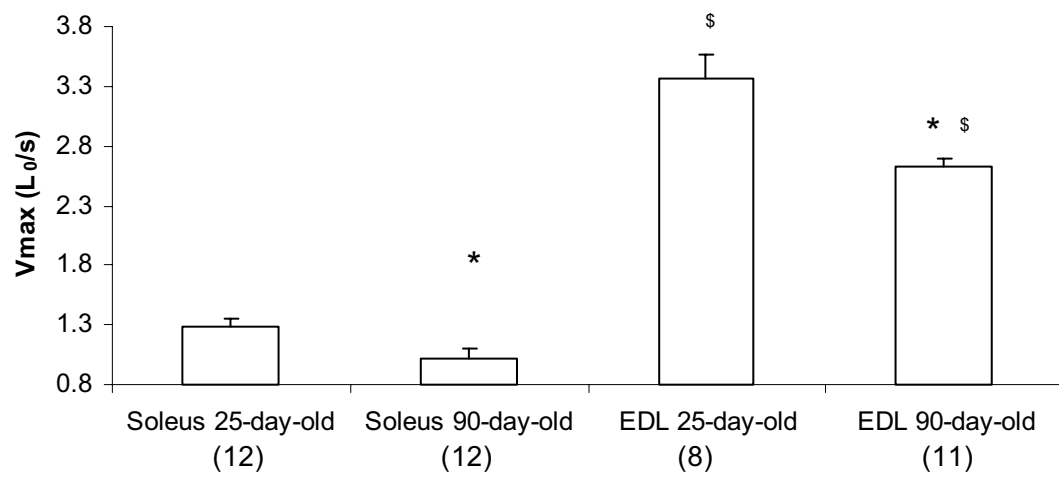
3

		Pt (mN)	P ₀ (mN)	P ₀ /MW (mN/mg)	CT (ms)	HRT (ms)
Soleus	25-day-old rat	82 ± 4 (24)	363 ± 18 (24)	5.76 ± 0.27 (24)	56.5 ± 0.9 (24)	72.9 ± 3.6 (24)
	90-day-old rat	228 ± 11 (21) *	1441 ± 46 (21) *	6.27 ± 0.22 (21)	73.4 ± 1.6 (21) *	115.4 ± 3 (21) *
EDL	25-day-old rat	170 ± 13 (22) \$	516 ± 34 (22)	10.01 ± 0.51 (22) \$	24.1 ± 0.5 (22) \$	24.9 ± 0.7 (22) \$
	90-day-old rat	909 ± 13 (17) * \$	2744 ± 143 (20) * \$	11.47 ± 0.49 (20) * \$	25.0 ± 0.4 (17) \$	25.8 ± 0.4 (17) \$

4

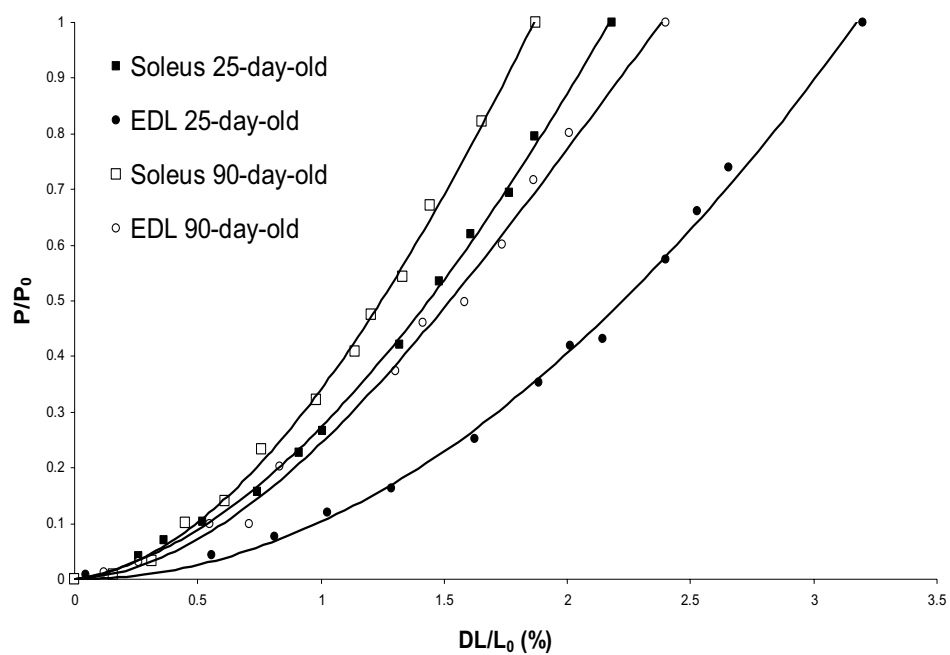
5

(Figure1)



1 (Figure2)

2



3

4

5

6

1 (TableII)

2

		Compliance at P_0 $(L_0/P_0) \cdot 10^2$	Compliance at $0.2P_0$ $(L_0/P_0) \cdot 10^2$	Area $(\Delta L/L_0) \cdot (P/P_0) \cdot 10^4$	Maximal extension (% L_0)
Soleus	25-day-old rat (12)	1.3 ± 0.03	2.6 ± 0.1	83 ± 2	2.22 ± 0.06
	90-day-old rat (12)	1.15 ± 0.03	2.1 ± 0.05 *	69 ± 2 *	1.78 ± 0.05 *
EDL	25-day-old rat (10)	1.60 ± 0.09 \$	3.24 ± 0.13 \$	101 ± 4 \$	2.83 ± 0.11 \$
	90-day-old rat (11)	1.75 ± 0.07 \$	2.62 ± 0.20 * \$	92 ± 7 \$	2.40 ± 0.09 * \$

3

4

1

2 (Table III)

3

		Endurance index at 30 s	Endurance index at 60 s	Endurance index at 90 s	Endurance index at 120 s
Soleus	25-day-old rat (12)	82.6 ± 2.9	74.7 ± 3.1	69.4 ± 3.3	64.1 ± 3.1
	90-day-old rat (7)	90.5 ± 3.9	86.6 ± 4.1 *	82.2 ± 4.4 *	77.1 ± 4.1 *
EDL	25-day-old rat (9)	77.1 ± 3.4	62.3 ± 3.6 \$	37.4 ± 3.9 \$	21.2 ± 3.6 \$
	90-day-old rat (6)	81.2 ± 4.2	58.3 ± 4.4 \$	29.0 ± 4.7 \$	16.7 ± 4.4 \$

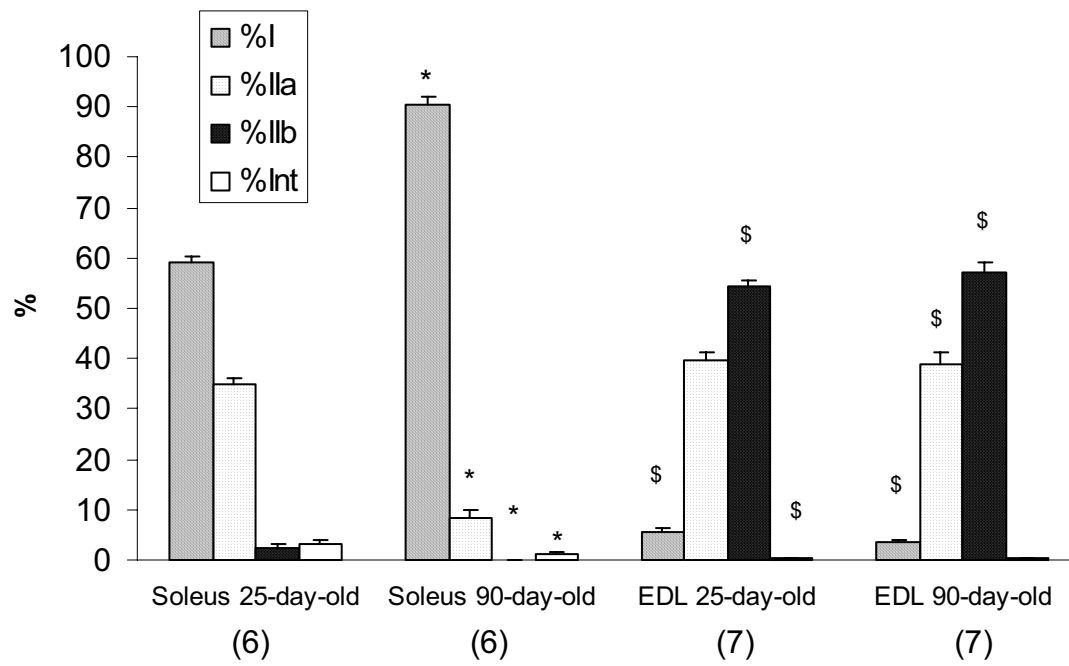
4

5

6

7

(Figure3)



LEGENDS OF TABLES AND ILLUSTRATIONS:

Table I: Twitch (P_t) and tetanic (P_0) tension, relative tetanic tension (P_0/MW) and contraction time (CT) and half relaxation time (HRT) in soleus and EDL muscles of 25-day-old and 90-day-old rats. Values are means $\pm$ SE (number of observations in parentheses). * indicate a significant effect of age at $p < 0.05$. \$ indicate a significant difference between soleus and EDL muscles for the same age at $p < 0.05$.

Table II: Tension/extension properties of soleus and EDL muscles of 25-day and 90-day-old rat. Values are means $\pm$ SE (number of observations in parentheses). * indicate a significant effect of age at $p < 0.05$. \$ indicate a significant difference between soleus and EDL muscles for the same age at $p < 0.05$.

Table III: Endurance index at 30, 60, 90 and 120 s for soleus and EDL in 25-day and 90-day-old rats. Values are means $\pm$ SE (number of observations in parentheses). * indicate a significant effect of age at $p < 0.05$. \$ indicate a significant difference between soleus and EDL muscles for the same age at $p < 0.05$.

Figure 1 : Maximal shortening velocity (V_{max}) obtained for soleus and EDL muscles in 25-day and 90-day-old rats. (number of observations in parentheses). * indicate a significant effect of age at $p < 0.05$. \$ indicate a significant difference between soleus and EDL muscles for the same age at $p < 0.05$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9

Figure 2 : Typical tension-extension curves obtained for soleus and EDL muscles in 25-day and 90-day-old rats.

Figure 3 : Percentage distribution of fibres in soleus and EDL muscles (number of observations in parentheses). * indicate a significant effect of age at $p<0.05$. \$ indicate a significant difference between soleus and EDL muscles for the same age at $p<0.05$.

REFERENCES :

1. Schmalbruch, H. Skeletal muscle. Springer, Heidelberg, 1985.
2. Ho KW, Heusner WW, Van Huss WD. Postnatal muscle fibre histochemistry in the rat. J Embryol Exp Morphol 1983, 76:37-49.
3. Punkt K, Krug H, Huse J, Punkt J. Region and age-dependent variations of muscle fibre properties. Acta Histochem 1998, 100:37-58.
4. Punkt K, Naupert A, Asmussen G. Differentiation of rat skeletal muscle fibres during development and ageing. Acta Histochem 2004, 106:145-54.
5. Umezu Y, Hachisuka K, Ueda H, Yoshizuka M, Ogata, H, Fujimoto S. Histochemical and immunological analyses of differentiating skeletal muscle fibers of the postnatal rat. Acta Anat (Basel) 1992,143:1-6.
6. Smith D, Green H, Thomson J, Sharratt M. Oxidative potential in developing rat diaphragm, EDL, and soleus muscle fibers. Am J Physiol 1988, 254:C661-8.
7. Ishihara A, Taguchi S. Histochemical differentiation of fibers in the rat slow and fast twitch muscles. Jpn J Physiol 1991, 41: 251-258.
8. Kovanen V. Effects of ageing and physical training on rat skeletal muscle. An experimental study on the properties of collagen, laminin, and fibre types in muscles serving different functions. Acta Physiol Scand 1989, 577(Suppl):1-56 .
9. Konishi M, Iwamoto S, Ohara H, Shimada M. Two-dimensional changes of muscle fiber types in growing rat hind limb. Acta Anat Nippon 2000, 75: 267-273.
10. Sugiura T, Matoba H, Miyata H, Kawai Y, Murakami N. Myosin heavy chain isoform transition in ageing fast and slow muscles of the rat. Acta Physiol Scand 1992, 144:419-23.

11. Yamaguchi A, Horio Y, Sakuma K, Katsuta S. The effect of nutrition on the size and proportion of muscle fibre types during growth. *J Anat* 1993, 182:29-36.
12. Close RI. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 1972, 52:129-97.
13. Close R. Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat during development. *J Physiol* 1964, 173:74-95.
14. Eken T, Gundersen K. Electrical stimulation resembling normal motor-unit activity: effects on denervated fast and slow rat muscles. *J Physiol* 1988, 402:651-69.
15. Almeida-Silveira MI, Perot C, Pousson M, Goubel F. Effects of stretch-shortening cycle training on mechanical properties and fibre type transition in the rat soleus muscle. *Pflugers Arch* 1994, 427:289-94.
16. Canon F, Goubel F. Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat soleus muscle. *Pflugers Arch* 1995, 429:332-7.
17. Diffie GM, Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM. Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension. *Am J Physiol* 1991, 260:C528-34.
18. Bosco C, Tihanyi J, Komi PV, Fekete G, Apor P. Store and recoil of elastic energy in slow and fast types of human skeletal muscles. *Acta Physiol Scand* 1982, 116:343-9.
19. Pousson M, Perot C, Goubel F. Stiffness changes and fibre type transitions in rat soleus muscle produced by jumping training. *Pflugers Arch* 1991, 419:127-30.
20. Linsel-Corbeil G, Goubel F. Series elasticity in frog sartorius muscle during release and stretch. *Arch Int Physiol Biochim* 1989, 97:499-509.
21. Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol* 1973, 234: 723-748.

- 1 22. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? Arch Neurol 1970,
2 23:369-79.
- 3 23. Pierobon-Bormioli S, Sartore S, Libera LD, Vitadello M, Schiaffino S. "Fast" isomyosins
4 and fiber types in mammalian skeletal muscle. J Histochem Cytochem 1981, 29:1179-88.
- 5 24. Powell PL, Roy RR, Kanim P, Bello MA, Edgerton VR. Predictability of skeletal muscle
6 tension from architectural determinations in guinea pig hindlimbs. J Appl Physiol 1984,
7 57:1715-21.
- 8 25. Segal SS, Faulkner JA. Temperature-dependent physiological stability of rat skeletal
9 muscle in vitro. Am J Physiol 1985, 248:C265-70.
- 10 26. Huijing PA, Nieberg SM, vanderVeen EA, Ettema GJ. A comparison of rat extensor
11 digitorum longus and gastrocnemius medialis muscle architecture and length-force
12 characteristics. Acta Anat 1994, 149:111-20.
- 13 27. Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C, Stienen GJ. Myofibrillar ATPase activity during
14 isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. J
15 Physiol 1994, 481:663-75.
- 16 28. Hill AV. The effect of series compliance on the tension developed in muscle twitch. Proc
17 R Soc Lond (Biol) 1951, 138: 325-329.
- 18 29. Stevens ED, Renaud JM. Use of dP/dt and rise time to estimate speed of shortening in
19 muscle. Am Physiol 1985, 249:R510-3J .
- 20 30. Hennig R, Lomo T. Effects of chronic stimulation on the size and speed of long-term
21 denervated and innervated rat fast and slow skeletal muscles Acta Physiol Scand 1987,
22 130:115-31.
- 23 31. Gundersen K, Eken T. The importance of frequency and amount of electrical stimulation
24 for contractile properties of denervated rat muscles. Acta Physiol Scand 1992, 145:49-57.

- 1 32. Reiser PJ, Moss RL, Giulian GG, Greaser ML. Shortening velocity in single fibers from
2 adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J Biol*
3 *Chem* 1985, 260:9077-80.
- 4 33. Lodder MA, de Haan A, Sargeant AJ. Effect of growth on efficiency and fatigue in
5 extensor digitorum longus muscle of the rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1994,
6 69:429-34.
- 7 34. Goubel F, Marini JF. Fibre type transition and stiffness modification of soleus muscle of
8 trained rats. *Pflugers Arch* 1987, 410:321-5.
- 9 35. Petit J, Filippi GM, Emonet-Denand F, Hunt CC, Laporte Y. Changes in muscle stiffness
10 produced by motor units of different types in peroneus longus muscle of cat. *J*
11 *Neurophysiol* 1990, 63:190-7.
- 12 36. Alnaqeeb MA, Al Zaid NS, Goldspink G Connective tissue changes and physical
13 properties of developing and ageing skeletal muscle. *J Anat* 1984, 139:677-89.
- 14 37. Ettema GJC, Huijing PA. Architecture and elastic properties of the series element of
15 muscle-tendon complex. In: Winters, J.M.; Woo, S.L.Y. (ed) *Muscle Multiple Systems:*
16 *Biomechanics and Movement Organization*. Springer-Verlag, New York, 1990, p 57-68.
- 17



Ofício nº 55/05

Recife, 17 de outubro de 2005

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

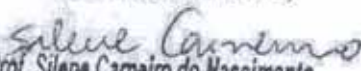
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. a. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado **DESNUTRIÇÃO NEONATAL: ASPECTOS ESTRUTURAIS E BIOMECÂNICOS DO DESENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS SUBMETIDOS OU NÃO A MANIPULAÇÃO SEROTONINÉRGICA**."

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 um parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA