

**RENATO RISSI**

**“ALTERAÇÕES MUSCULOESQUELÉTICAS EM  
CAMUNDONGOS OBESOS E DESNUTRIDOS APÓS  
PROTOCOLO DE IMOBILIZAÇÃO ARTICULAR DO  
MEMBRO PÉLVICO UNILATERAL.”.**

**Campinas, 2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

RENATO RISSI

“ALTERAÇÕES MUSCULOESQUELÉTICAS EM  
CAMUNDONGOS OBESOS E DESNUTRIDOS APÓS  
PROTOCOLO DE IMOBILIZAÇÃO ARTICULAR DO  
MEMBRO PÉLVICO UNILATERAL”

Este exemplar corresponde à redação final  
da Dissertação defendida pelo candidato

*Renato Rissi*

*Renato Rissi*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Estrutural do Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,  
na área de Anatomia



Orientadora: Dra. Evanisi Teresa Palomari

Campinas, 2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R496a Rissi, Renato, 1988-  
Alterações musculoesqueléticas em camundongos obesos e desnutridos após protocolo de imobilização articular do membro pélvico unilateral / Renato Rissi. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Evanisi Teresa Palomari.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Imobilização. 2. Desnutrição proteica. 3. Obesidade. 4. Atrofia. I. Palomari, Evanisi Teresa, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Informações para Biblioteca Digital**

**Título em outro idioma:** Musculoskeletal changes in obese and malnourished mice after the protocol of hindlimb joint immobilization

**Palavras-chave em inglês:**

Immobilization

Protein malnutrition

Obesity

Atrophy

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Evanisi Teresa Palomari [Orientador]

Edson Rosa Pimentel

Flávia da Ré Guerra

**Data de defesa:** 31-07-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 31 de Julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Evanisi Teresa Palomari (Orientadora)



Assinatura

Dr. Edson Rosa Pimentel



Assinatura

Dra. Flávia Da Ré Guerra



Assinatura

Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

Dr. Marcelo Alves da Cunha

Assinatura



## RESUMO

No âmbito da ortopedia, a imobilização articular é um recurso terapêutico eficiente e amplamente utilizado na prática clínica. Apesar de seu uso ser indispensável no tratamento de doenças álgicas ou fraturas, a imobilização ocasiona no paciente uma limitação física temporária de suas habilidades, podendo influenciar em sua locomoção e em suas atividades do cotidiano. A obesidade interfere muitas vezes na relação do hormônio insulina com os mecanismos de síntese e degradação proteica nos músculos. Considerando que a insulina exerce papel fundamental facilitando a síntese e inibindo a proteólise, os pacientes obesos, podem apresentar um balanço negativo no que se diz respeito à formação e degradação da massa muscular em virtude das desordens que estes pacientes geralmente apresentam no perfil insulinêmico. O tecido muscular é a reserva mais importante de proteína disponível no organismo, porém, este tecido se encontra consideravelmente reduzido nos casos de desnutrição proteica. Durante o jejum parcial ou total, a proteína corporal é destruída para proporcionar aminoácidos ao organismo, traduzindo-se desta forma em uma perda de massa corporal total. Quando consideramos a obesidade e a desnutrição proteica, associadas a um paciente imobilizado, a interação dessas condições podem vir a potencializar os prejuízos musculoesqueléticos do paciente. O objetivo deste estudo foi verificar experimentalmente se a condição de imobilização articular potencializa as alterações musculoesqueléticas em animais obesos e desnutridos. Para tal, 60 camundongos da linhagem C57BL6 foram utilizados e divididos em quatro grupos: Controle (GC), Controle Imobilizado (GCI), Obeso Imobilizado (GOI), Desnutrido Imobilizado (GDI). A imobilização articular foi realizada utilizando-se um modelo com esparadrapo/gesso adaptado para uso em camundongos. Os animais permaneceram imobilizados durante 14 dias. A obesidade e a desnutrição proteica foram desenvolvidas por meio de ingestão alimentar de dieta específica para cada grupo. Realizou-se análise da atividade locomotora; quantificação sérica da enzima creatina quinase; análise histomorfométrica da tíbia e dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior; determinação do conteúdo de glicogênio intramuscular e zimografia das metaloproteinases (2 e 9). Como resultado, verificou-se a redução da atividade locomotora noturna nos animais imobilizados em relação ao GC; aumento dos níveis séricos da enzima CK nos animais imobilizados em relação ao GC; redução na área e no diâmetro das fibras musculares do gastrocnêmio e tibial anterior nos grupos imobilizados em relação ao GC; diminuição do conteúdo de glicogênio intramuscular no GDI em relação ao GCI; aumento da expressão das metaloproteinases 2 e 9 nos grupos imobilizados em relação ao GC. Portanto, podemos concluir que o protocolo de imobilização articular utilizado é capaz de gerar atrofia musculoesquelética nos animais. Já no caso da interação entre as condições de obesidade/imobilização e desnutrição/imobilização, o tecido musculoesquelético apresenta acréscimo na atrofia, revelando elevado prejuízo muscular nessas condições.

Palavras-chave: Imobilização; Desnutrição proteica; Obesidade; Atrofia.



## ABSTRACT

Within orthopedics, joint immobilization is an effective therapeutic tool and widely used in clinical practice. Although their use is essential in the treatment of painful diseases or fractures, the patient immobilization causes a temporary physical limitation of their abilities and may influence its locomotion and in their daily activities. Obesity often interferes to the hormone insulin in relation with the mechanisms of protein synthesis and degradation in muscle. Considering that insulin plays a key role in facilitating the synthesis and inhibiting proteolysis, obese patients may have a negative balance as regards the formation and degradation of muscle mass because of disorders in these patients insulinemic profile. Muscle tissue is the most important reserve available protein in the body, however, this tissue is considerably reduced in cases of malnutrition. During the partial or total fasting, the body protein is destroyed to provide amino acids to the body, thus translating into a loss of total body mass. When we consider obesity and protein malnutrition associated with an immobilized patient, the interaction of clinical conditions can come to enhance the patient's musculoskeletal damage. The aim of this study was to verify experimentally if the condition of joint immobilization enhances musculoskeletal changes in obese and malnourished animals. To this end, 60 mice C57BL6 were used and divided into four groups: Control (CG), Immobilized Control (ICG), Immobilized obese (IOG), Immobilized Malnourished (IMG). The joint immobilization was performed using a model with tape / plaster adapted for use in mice. The animals remained immobilized for 14 days. Obesity and protein malnutrition were developed by means of specific diets food intake for each group. We performed analysis of locomotor activity; quantification of serum CK; histomorphometric analysis of the tibia and the gastrocnemius and tibialis anterior muscles; determining the content of intramuscular glycogen; zymography of the metalloproteinases (2 and 9). As a result, we found reduction in nocturnal locomotor activity in immobilized animals relative to CG; increased serum levels of creatine kinase in the immobilized animals relative to CG; reduction in the area and diameter of the muscle fibers of the gastrocnemius and tibialis anterior in groups immobilized relative to CG; decreased content of intramuscular glycogen in the group IMG relative to ICG; increased expression of metalloproteinases 2 and 9 in groups immobilized relative to CG. Therefore, we conclude that the joint immobilization protocol used is able to generate skeletal muscle atrophy in animals. In the case of the interaction between the conditions of obesity / immobilization and malnutrition / immobilization, tissue musculoskeletal presents increase in atrophy, revealing high muscle injury in these conditions.

**Keywords:** Immobilization; Obesity; Protein malnutrition; atrophy.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
DEDICATÓRIAS.....	xiii
AGRADECIMENTOS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xix
LISTA DE TABELAS.....	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
LISTA DE ANEXOS.....	xxv
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Imobilização.....	3
2.2. Imobilização e o tecido muscular.....	4
2.3. Imobilização e o tecido ósseo.....	6
2.4. Obesidade e o tecido muscular.....	7
2.5. Desnutrição.....	10
2.6. Desnutrição e o tecido muscular.....	12
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo Geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1. Delineamento experimental.....	17
4.2. Animais da pesquisa.....	17
4.3. Técnica de imobilização.....	18
4.4. Indução da obesidade e desnutrição nos animais.....	19
4.5. Avaliação da atividade locomotora.....	20
4.6. Eutanásia dos animais.....	21
4.7. Quantificação sérica da enzima Creatina Quinase (CK).....	22
4.8. Preparo do osso e dos músculos para a técnica de Hematoxilina e Eosina.....	22

4.9. Estudos histomorfométricos .....	23
4.10. Determinação do conteúdo de glicogênio muscular .....	24
4.11. Zimografia das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 .....	24
4.12 Tratamentos estatísticos.....	26
5. RESULTADOS .....	27
5.1. Caracterização dos grupos Controle, Obeso e Desnutrido. ....	27
5.2. Análise da atividade locomotora.....	29
5.3. Análise histomorfométrica e peso (mg) da massa muscular. ....	31
5.4. Análise histomorfométrica do tecido ósseo (tíbia) .....	35
5.5. Quantificação sérica da enzima Creatina Quinase – CK .....	36
5.6. Dosagem do glicogênio intramuscular .....	36
5.7. Zimografia das enzimas MMP-2 e MMP-9 .....	37
6. DISCUSSÃO .....	41
6.1. Peso corpóreo e consumo alimentar .....	41
6.2. Análise da atividade locomotora.....	43
6.3. Dados histológicos dos músculos .....	45
6.4. Dados histológicos do tecido ósseo (tíbia) .....	49
6.5. Dosagem da enzima Creatina Quinase (CK) .....	52
6.6. Dosagem do glicogênio intramuscular .....	55
6.7. Zimografia das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 .....	57
7. CONCLUSÃO .....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
ANEXOS .....	83

## DEDICATÓRIAS

Dedico esse trabalho a **DEUS**, por estar sempre no meu caminho, iluminando e guiando-me para as escolhas certas.

À **MINHA FAMÍLIA**, sem a qual este momento não seria possível. **PAI** e **MÃE**, meus anjos, as pessoas mais incríveis desse mundo, eternos amores da minha vida, exemplos de compreensão, bondade e carinho, amo vocês, obrigado por tudo. A **MINHA IRMÃ**, exemplo de garra, coragem, inteligência, conduta e serenidade, obrigado pela força.

A todos meus verdadeiros **AMIGOS**, sem fazer menção em particular, até para não cometer injustiça, pelo apoio, companheirismo, paciência e principalmente momentos de descontração que fizeram com que eu superasse os momentos difíceis e chegasse até aqui.

A minha **NAMORADA**, que de forma especial e carinhosa me deu força, coragem e incentivo, sempre me apoiando nos momentos difíceis fazendo com que eu chegasse até aqui.

A todos os meus **FAMILIARES**, que de alguma forma sempre acreditaram em mim e no meu potencial.



**La Venganza Nunca es Buena Mata  
el Alma y la Envenena.**

**Ramón Valdez**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a **DEUS** por ser à base das minhas conquistas, por me dar força nos momentos difíceis e principalmente por me conceber a dádiva suprema da vida.

À minha orientadora **EVANISI TERESA PALOMARI** pelos ensinamentos, dedicação, paciência e auxílio que foram de fundamental importância para a elaboração deste trabalho.

Ao meu ex-professor **MARCOS ALEXANDRE MENDES LUZ**, por ser o grande incentivador de minha vinda para a Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Aos **COMPONENTES DA BANCA** deste trabalho, pela disponibilidade e generosidade em contribuir para seu enriquecimento. Muito obrigado pela contribuição na minha evolução acadêmica e profissional.

Aos **PROFESSORES EDSON ROSA PIMENTEL e EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO**, por permitirem a utilização dos equipamentos e da estrutura de seus respectivos Laboratórios de Pesquisa.

À **Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**, pela infraestrutura concedida para minha formação e conclusão deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural**, por ter concedido o tempo necessário para finalizar este trabalho.

Ao **CNPq**, por fomentar financeiramente este trabalho.



**LISTA DE FIGURAS**

- FIGURA 1.** Protocolo de imobilização articular do membro pélvico dos animais. A= plano lateral direito; B= plano ventral. .... **19**
- FIGURA 2.** Equipamentos para o teste de avaliação da atividade locomotora dos animais. .... **21**
- FIGURA 3.** Medidas da Massa corpórea dos animais (g) antes e após o procedimento de imobilização. .... **28**
- FIGURA 4.** Consumo semanal das dietas (g) antes e após o procedimento de imobilização. .... **28**
- FIGURA 5.** Atividade locomotora diurna dos animais antes e durante o período de imobilização. .... **30**
- FIGURA 6.** Atividade locomotora noturna dos animais antes e durante o período de imobilização. .... **31**
- FIGURA 7.** Cortes histológicos para determinação da área e diâmetro das fibras do músculo gastrocnêmio. .... **32**
- FIGURA 8.** Cortes histológicos para determinação da área e diâmetro das fibras do músculo tibial anterior. .... **34**
- FIGURA 9.** Dosagem sérica da enzima CK (g/dl). .... **36**
- FIGURA 10.** Análise conjunta da dosagem de glicogênio intramuscular dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior (g/100g). .... **37**

**FIGURA 11.** Gel de zimografia para análise da isoforma ativa das MMP-2 e MMP-9 no músculo gastrocnêmio. .... **38**

**FIGURA 12.** Gel de zimografia para análise da isoforma ativa das MMP-2 e MMP-9 no músculo tibial anterior. .... **39**

**LISTA DE TABELAS**

- TABELA 1.** Valores absolutos do índice de Lee, peso do tecido adiposo retroperitoneal (mg) e peso do tecido adiposo perigonadal (mg) avaliados de acordo com a dieta específica ingerida por cada grupo. .... **29**
- TABELA 2.** Valores absolutos da massa muscular (mg), área de fibras ( $\mu^2$ ) e diâmetro de fibras ( $\mu$ ) do músculo gastrocnêmio. .... **33**
- TABELA 3.** Valores absolutos da massa muscular (mg), área de fibras ( $\mu^2$ ) e diâmetro de fibras ( $\mu$ ) do músculo tibial anterior. .... **34**
- TABELA 4.** Valores absolutos do número de osteócitos, espessura da camada cortical ( $\mu$ ) e diâmetro do canal medular da tíbia ( $\mu$ ). .... **35**
- TABELA 5.** Valores absolutos da quantificação das enzimas MMP-2 e MMP-9 ativa no músculo gastrocnêmio. .... **38**
- TABELA 6.** Valores absolutos da quantificação das enzimas MMP-2 e MMP-9 ativa no músculo tibial anterior. .... **39**



**LISTA DE ABREVIATURAS**

- ADP** – Adenosina Difosfato;
- ANOVA** – Análise de variância;
- ATP** - Adenosina Trifosfato;
- CEMIB** – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica;
- CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais;
- CK** – Creatina quinase;
- cm** – Centímetro;
- CP** – Creatina Fosfato;
- °C** – Graus Celsius;
- EDTA** - Ácido Etileno Diamino Tetracético;
- GC** – Grupo Controle;
- GCI** – Grupo Controle Imobilizado;
- GDI** – Grupo Desnutrido Imobilizado;
- GLUT** - Transportadores de glicose;
- GOI** – Grupo Obeso Imobilizado;
- g** – Gramas;
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Ácido Sulfúrico;
- HCL** – Ácido clorídrico;
- HFD** - High-Fat Diet;
- h** – Hora;
- IFRPRI** - O Instituto Internacional de Pesquisa de Políticas Alimentares;
- IGF-1** – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
- IMC** - Índice de Massa corpórea;
- kDa** – Unidade de Massa Atômica;
- KOH** – Hidróxido de Potássio;
- kg** – Kilogramas;
- LDH** – Lactato Desidrogenase;
- MEC** – Matriz Extra Celular;

**mL** – mililitro;  
**mM** – milimolar;  
**MMP-2** – Metaloproteinase dois;  
**MMP-9** – Metaloproteinase nove;  
**MMPs** – Metaloproteinases;  
**mg** – Miligramas;  
**OMS** - Organização Mundial de Saúde;  
**pH** - potencial hidrogeniônico  
**Pi** – Fosfato Inorgânico;  
**PKC** - Proteína Kinase C zeta;  
**RNA** – Acido Ribonucleico;  
**RNA<sub>m</sub>** – Ácido Ribonucleico mensageiro;  
**rpm** – Rotação por minutos;  
**SBCAL** - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório;  
**SNC** – Sistema Nervoso Central;  
**TIMPs** - Inibidores Teciduais de Metaloproteinases;  
**UNICAMP** – Universidade Estadual de Campinas;  
**UV** – ultravioleta;  
**V** - volts  
**μL** – microlitro;  
**μ/l** – unidades por litro;  
**μm** – Micrômetro;  
**%** - por cento;

**LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO I.</b> Composição nutricional das dietas. ....	<b>83</b>
<b>ANEXO II.</b> Certificado do comitê de ética para uso de animais. ....	<b>85</b>



## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

A imobilização articular é um recurso utilizado com frequência na prática clínica, como forma de tratamento de doenças álgicas ou fraturas. Apesar de seu uso ser indispensável nessas situações, a imobilização articular ocasiona no paciente uma limitação física temporária de suas habilidades, podendo influenciar em sua locomoção e em suas atividades do cotidiano (SANTOS-JUNIOR et al., 2010). Segundo Caierão et al. (2007), prejuízos como atrofia do músculo e consequente redução de força, são fenômenos notados mesmo em curtos períodos de imobilização.

De forma geral, a obesidade e a desnutrição proteica afetam um grande número de pessoas na população mundial. Ambas as morbidades possuem características específicas, o que pode acarretar efeitos deletérios para o tecido muscular dos acometidos (OMS, 2012).

A obesidade, por vezes, está associada à irregularidade do metabolismo do músculo esquelético, mais notadamente à sua resistência insulínica. Com isso, além de exercer problemas no transporte e captação de glicose, afeta o metabolismo energético do tecido, a resistência à insulina e pode, também, envolver o metabolismo reduzido das proteínas, ocasionando um desequilíbrio no mecanismo de síntese e degradação proteica. (O'BRIEN & GRANNER, 1991; KIMBALL et al., 1994).

Estudos mostraram que a restrição alimentar afeta o crescimento e diferenciação de tecidos e células no organismo por meio de um desequilíbrio no mecanismo de anabolismo/catabolismo das células, uma vez que esse processo é facilitado pelas condições de restrição alimentar. Em casos como a desnutrição proteica os músculos se apresentam diminuídos em seu volume, delgados e encurtados devido à atrofia das miofibrilas (BAPTISTA 2008; SANTOS, 2010).

Pautados nessas observações, vimos a necessidade de avaliar o tecido musculoesquelético de animais desnutridos e obesos sob condições de imobilização articular, levando-se em conta que ambas as morbidades, associadas ao recurso da imobilização, podem vir a apresentar interações moleculares que potencializam desordens musculoesqueléticas ainda pouco exploradas.

A caracterização do tecido musculoesquelético por meio das técnicas experimentais propostas, tem o intuito de avaliar o risco/benefício que a técnica de imobilização apresenta para portadores de obesidade e desnutrição proteica, visto que os mesmos estão rotineiramente sujeitos a passarem por um procedimento dessa natureza. A finalização deste trabalho visa contribuir com informações científicas relevantes que possam auxiliar na prática clínica em casos onde portadores das morbidades citadas tenham que passar por uma situação de imobilização articular.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Imobilização

No âmbito da ortopedia, a imobilização é um recurso terapêutico eficiente e amplamente utilizado em diversas situações como, por exemplo, no tratamento de fraturas ósseas, rupturas ligamentares, lesões musculares e cirurgias que necessitam de um longo tempo de desuso muscular (REARDON et al., 2001).

A limitação física temporária, acarretada pela imobilização de uma parte do corpo, acomete milhares de pessoas em todo o mundo. Seja por doenças ou acidentes, estas pessoas passam pela inconveniente situação de ter uma parte de seu corpo imobilizada, ora por meio de atadura gessada, ora com fixadores internos ou externos. Ambas as situações levam o paciente a um quadro de limitação provisória de suas habilidades plenas, o que pode influenciar negativamente sua locomoção, assim como suas atividades diárias (SANTOS-JUNIOR, 2010).

Vários modelos experimentais em animais são propostos no intuito de estudar as mudanças que envolvem um processo de imobilização, merecendo destaque, os modelos invasivos e não invasivos (SANTOS-JUNIOR, 2010).

Na classe dos invasivos podemos encontrar a desnervação, tenotomia e fixação da articulação por meio de pinos ou fios (BOOTH e KELSO 1973; ITAI et al., 2004). Dentre estas técnicas, destaca-se com maior frequência de uso a desnervação. Essa técnica é alcançada por meio de secção ou esmagamento do nervo, ou ainda por bloqueio químico, eliminando a comunicação do músculo com o nervo, impedindo a ocorrência de reflexos musculares (MUSACCHIA et al., 1988; MARIMUTHU et al., 2010).

Com relação aos não invasivos, encontramos o modelo de suspensão do membro, imobilização por órtese de algodão, talas de gesso e órteses de resina acrílica (TANAKA et al., 2004; SILVA et al., 2006; ONO et al., 2007). De acordo com pesquisas, a utilização de meios de imobilização não invasivos, como a imobilização gessada, permite a manutenção da integridade dos nervos, músculos e tendões, além de se tratar de procedimento

semelhante ao das condições que vivenciamos na prática clínica, tornando-se dessa forma um modelo mais indicado para estudar os efeitos da diminuição do trabalho muscular (ITAI et al., 2004). No que diz respeito às imobilizações invasivas, estas apresentam peculiaridades que podem alterar os índices de atrofia muscular, ficando dessa forma como segunda opção para o uso em experimentos (ITAI et al., 2004; SANTOS-JUNIOR, 2010).

No entanto, é necessário salientar que os estudos de imobilização apresentam caráter multifatorial diferindo quanto ao modelo e material utilizado para promover o desuso, tempo da imobilização, posição articular, atividade eletromiográfica e tipagem das fibras musculares analisadas, e isso, conseqüentemente, determina os resultados obtidos (DIAS et al., 2005, DURIGAN et al., 2005).

## **2.2. Imobilização e o tecido muscular**

Cerca de 40% do corpo humano é composto por musculatura esquelética, cuja massa e composição são necessárias para a correta regulação de respostas motoras, envolvendo as atividades físicas diárias, manutenção e execução dos movimentos, fala e respiração. As alterações observadas em sua composição e função podem ser vistas em condições patológicas, geralmente em quadros de atrofia muscular esquelética (ST-AMAND et al., 2001; ZHANG et al., 2006; PELIZZARI et al., 2008). De acordo com GUYTON e HALL (2011) todos os músculos do corpo estão constantemente em processo de remodelagem para se adequarem às funções impostas e podem ocorrer alterações em seu comprimento e diâmetro.

O músculo esquelético dos vertebrados é composto por dois tipos principais de fibras musculares (ARRINGTON et al., 1995; CAHILL et al., 1997; CHINGUI, 2008):

- As fibras do tipo I ou vermelhas, de contração lenta ou lenta oxidativa, possuem baixa força de contração e alta resistência à fadiga. São constituídas de um maior número de mitocôndrias, sua principal fonte energética é o sistema aeróbio e exibem cor vermelho escuro devido a grande vascularização e alto conteúdo de mioglobina e citocromos.

- As fibras do tipo II ou branca de contração rápida, possuem maior diâmetro, com predomínio de metabolismo anaeróbio. São subdivididas nos tipos II-A e II-B. As fibras do tipo II-A ou oxidativa glicolítica são brancas e com uma capacidade oxidativa superior, o que as torna ligeiramente resistente à fadiga. Essas exibem um perfil contrátil, metabólico e morfológico intermediário entre os outros dois tipos de fibras. As fibras do tipo II-B ou glicolítica rápida possuem o tempo de contração mais rápido, menor resistência à fadiga, maior força de contração, menor quantidade no número de mitocôndrias e são mais claras por serem praticamente destituídas de mioglobina.

A plasticidade das fibras musculares esqueléticas permite que estas se adaptem, deflagrando mudanças na tipagem ou no tamanho das fibras, portanto, múltiplos estímulos podem promover essas mudanças, merecendo destaque a imobilização, inatividade prolongada e desnervação (SALVINI, 2000). Tanaka et al., (2004) observaram que o músculo sóleo tem maior comprometimento em situação de desuso por ser predominantemente formado por fibras do tipo I, ao passo que músculos que tenham predomínio de fibras do tipo II são menos comprometidos nesta situação.

Segundo Ferreira et al., (2004) a estrutura e a função dos músculos esqueléticos como um todo, são condicionadas por fatores, tais como: inervação motora, carga mecânica imposta ao tecido, atividade proprioceptiva, mobilidade das articulações e realização de ciclos de estiramento/encurtamento. O comprometimento de um desses fatores certamente acarretará um quadro de hipotrofia ou atrofia muscular.

Embora seja um recurso muito utilizado para tratamento de lesões musculoesqueléticas, a imobilização causa efeitos deletérios em um músculo após um curto período de tempo, tais como encurtamento e atrofia muscular, distúrbios na relação área/tecido conjuntivo intramuscular das fibras, diminuição do conteúdo protéico, diminuição da atividade contrátil e da força e aumento da fatigabilidade muscular. Entretanto, o seu entendimento fisiológico necessita ser procurado de forma satisfatória (HADDAD et al., 2003).

A posição em que o membro é imobilizado influencia significativamente no grau de atrofia muscular esquelética, sendo a posição encurtada do músculo gastrocnêmio (flexão

plantar) a causadora de um rápido aumento na atrofia em relação à posição neutra e alongada (JOKL & KONSTADT, 1983; WILLIANS & GOLDSPINK, 1984;).

No âmbito experimental, Lima-Silva et al., (2007) mostraram que o período de sete dias de imobilização é suficiente para promover o estado de hipotrofia e induzir importantes adaptações dos sarcômeros, bem como alterações químico-metabólicas na musculatura esquelética de ratos. A perda de massa muscular associada ao prejuízo na força são as primeiras modificações que ocorrem como resultado da imobilização. Essa perda é mais acentuada nas primeiras 72 horas, com índices de 14 a 17%, reduzindo sua velocidade após uma semana de imobilização (BOOTH, 1982; MACHIDA, 2004).

Segundo Ploug et al., (1995) o desuso muscular produzido por condições de inatividade prolongada como a imobilização, induz o quadro de resistência à insulina no musculo esquelético, potencializando assim o seu estado catabólico.

As alterações induzidas pela imobilização de um segmento não se limitam apenas ao músculo, também é comum ser observado transtornos de inervação, atrofia óssea, alterações ligamentares, circulação, edema e rigidez (CARVALHO et al., 2008; SANTOS-JUNIOR et al., 2010).

Na intenção de minimizar as alterações causadas pelo desuso muscular, têm-se utilizado diversas técnicas, tais como: a estimulação elétrica neuromuscular, utilização de fármacos e de suplementos (CANCELLIERO, 2004; DELFINO et al., 2006; SILVA & CANCELLIERO, 2006).

### **2.3. Imobilização e o tecido ósseo**

Os ossos são peças duras, resistentes, que servem de apoio aos músculos que os circundam. Podem apresentar-se como elementos protetores, onde um conjunto de ossos unidos formam cavidades que alojam sistemas e órgãos, ou como elementos articulares, onde são unidos entre si por cápsulas, ligamentos e músculos, fazendo parte do sistema locomotor (LATARJET & RUIZ-LIARD 1996).

O tecido ósseo é dinâmico e está em constante remodelamento. É um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado. De acordo com a lei de Wolff, cada mudança na função óssea é seguida de mudanças na arquitetura interna e conformação externa do osso. Dessa forma a carga mecânica é uma particularidade essencial para o funcionamento normal do tecido ósseo (CORNWALL, 1984; TREBACZ, 2001).

A realização de determinado exercício ativo pode aumentar ou diminuir o peso, o comprimento e a rigidez óssea, dependendo da idade, do gênero e de outras características do indivíduo. Já a falta de exercícios, imobilidade, fraqueza e lesão neuromuscular afetam de forma negativa o metabolismo do tecido ósseo (CORNWALL, 1984).

A imobilização resulta em um desequilíbrio no metabolismo ósseo seguido por uma rápida perda óssea e consequente prejuízo da função mecânica do osso (TREBACZ, 2001). Esta redução da massa óssea em função da imobilização é destacada pela junção de dois componentes, o aumento da reabsorção óssea pelos osteoclastos e uma redução na formação de massa óssea pelos osteoblastos (SANTOS-JUNIOR, 2010).

A perda óssea e de suas propriedades, decorrente de um longo período de imobilização, tende a ocorrer em estágios, sendo o primeiro após poucos dias de imobilização, o segundo mais tardio, com uma perda óssea mais lenta e de longa duração e o último, chamado de período de estabilização, que pode reduzir a massa óssea entre 40% e 70% da original (DITTMER & TEASELL, 1993). Devemos ainda ressaltar que o tempo necessário para a recuperação de uma atrofia óssea é consideravelmente maior do que o tempo em que se desenvolve tal fato em pacientes imobilizados (TREBACZ, 2001).

#### **2.4. Obesidade e o tecido muscular**

Os maus hábitos alimentares estão associados a diversos prejuízos à saúde, entre eles, a obesidade, cujos índices têm crescido nas últimas décadas, como resultado de um aumento no consumo de alimentos com alta densidade calórica e redução na atividade

física, ocorrendo assim, um problema de saúde pública no Brasil e no mundo (ALMEIDA, et al., 2002; ESCOBAR 2009).

A obesidade pode ser definida como sendo um acúmulo anormal e/ou excessivo de gordura nos tecidos, fato que pode ser prejudicial à saúde. Considerada uma doença multifatorial, ela é desenvolvida, principalmente, por um balanço energético positivo, ou seja, a ingestão alimentar é superior ao gasto energético do indivíduo (OMS, 2012).

O IMC (índice de massa corporal) é a forma mais utilizada para avaliação da obesidade em adultos e, também, recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012), visto que pode ser aplicado para ambos os sexos e adultos de todas as faixas etárias. Esse índice é calculado dividindo-se o peso do paciente em quilogramas (Kg) pela sua altura, em metros, elevada ao quadrado, e o valor assim obtido estabelece o diagnóstico da obesidade. Ainda segundo a OMS (2012), valores de IMC maiores que 25, caracterizam sobrepeso e, valores maiores que 30, caracterizam a obesidade.

O sobrepeso e a obesidade são considerados o quinto fator principal de mortalidade em adultos. A OMS (2012) destacou que no mundo, cerca de 1,4 bilhões de adultos, encontram-se acima do peso e dentre esses, mais de 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres estão enquadrados na categoria de obesos.

No âmbito da saúde pública, a obesidade torna-se preocupante por ser um importante fator de risco para outras morbidades como: enfermidades cardiovasculares (principalmente cardiopatias e acidentes cerebrovasculares); transtornos do aparelho locomotor (aumento do risco de fraturas); dificuldades respiratórias; hipertensão arterial sistêmica; diabetes tipo II; (MELLO, et al., 2004).

Segundo Martins & Marinho (2003), a obesidade, principalmente a visceral, é um grave fator de risco de distúrbio na homeostase glicose/insulina, pois resulta em várias alterações fisiopatológicas, como o aumento da produção hepática de glicose e diminuição da captação de glicose pelo tecido muscular.

A obesidade tem sido apontada como um dos principais fatores de risco para o diabetes tipo II. Estima-se que entre 80 e 90% dos indivíduos acometidos são obesos e o risco está diretamente associado ao aumento do índice de massa corporal (SARTORELLI, 2003). Francischi (2000) relatou que, para um aumento de 10% no peso corporal, há aumento de 2 mg/dl na glicemia em jejum e que se considerando a distribuição da gordura

corporal, uma circunferência da cintura maior do que 100 cm pode isoladamente elevar o risco do desenvolvimento de diabetes em 3,5 vezes no indivíduo.

De acordo com O'Brien e Granner (1991) e Kimbal et al., (1994) a obesidade interfere muitas vezes na relação do hormônio insulina com os mecanismos de síntese e degradação proteica nos músculos. Considerando que a insulina exerce papel fundamental facilitando a síntese e inibindo a proteólise, as pessoas obesas, podem apresentar um balanço negativo, no que se diz respeito à formação e degradação da massa muscular corpórea, em virtude das desordens que estes pacientes apresentam no perfil insulinêmico. Portanto, organismos com deficiência no aproveitamento da insulina demonstram perda de massa muscular, déficit no crescimento e predomínio da degradação sobre a síntese proteica nos tecidos.

Segundo O'Brien e Granner (1991) as ações da insulina sobre o metabolismo das proteínas e dos aminoácidos são orientadas no sentido do anabolismo. De acordo com os autores, a insulina após interação com o receptor de membrana, exerce ação anabólica sobre o metabolismo proteico por meio dos seguintes mecanismos: estimula o transporte de aminoácidos para o interior da célula e aumenta, ao nível ribossômico, a eficiência do processo de tradução atuando na etapa de iniciação da síntese proteica. Os efeitos anabólicos desse hormônio são reforçados por suas ações anticatabólicas. A insulina inibe a proteólise, suprime a liberação e inibe a oxidação dos aminoácidos essenciais (ADAMS, 1998; LUCIANO et., al., 1998). Essas ações da insulina sobre o metabolismo proteico são especialmente importantes no músculo, mas estão, também, presentes, em maior ou menor grau, em outros tecidos (SOUZA & LUCIANO, 1996). Além de sua ação ao nível ribossômico, a insulina partilha com os chamados fatores de crescimento (IGFs) a capacidade de estimular o crescimento celular e, portanto, a síntese proteica, atuando na transcrição e aumentando a síntese de RNA mensageiro nos tecidos, inclusive nos músculos (KIMBALL et., al, 1994).

Com relação ao metabolismo dos carboidratos, a homeostasia energética das fibras musculares se mantém pela insulina cuja ação facilita a captação e o metabolismo da glicose (CHINGUI, 2008). O transporte de glicose pelas membranas das fibras musculares é feito por transportadores chamados GLUT. A insulina, após interação com o receptor de membrana, estimula os transportadores de glicose (GLUT), facilitando a entrada de glicose

para a célula. Desta forma, fica caracterizada como um hormônio de extrema importância para o metabolismo dos carboidratos em muitos tecidos, inclusive no tecido muscular (LUCIANO & MELO, 1998).

## **2.5. Desnutrição**

A fome tem sido considerada um sério problema social, e desponta mundialmente, como uma preocupante moléstia no contexto da saúde pública. O Instituto Internacional de Pesquisa de Políticas Alimentares (IFRPRI, 2010) demonstrou que, no mundo, 925 milhões de pessoas se encontram dentro dos limites de desnutrição e que, praticamente, a metade dos indivíduos afetados são crianças.

De acordo com Engle (1991) o índice de desnutrição é particularmente alto em crianças e ocorre, principalmente, em virtude destas, nessa fase, serem dependentes de cuidados maternos. Com isso, a desnutrição é uma problemática importante da saúde pública mundial, devido a sua magnitude e consequências desastrosas para o crescimento, sobrevivência e desenvolvimento das crianças. Desta forma devem ser tomadas medidas de prevenção e controle para amenizar suas causas e consequências (MONTE, 2000).

A desnutrição é caracterizada por ser uma doença que decorre do aporte alimentar insuficiente em energia e nutrientes ou, ainda, com alguma frequência, do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos (MONTEIRO, 2003). Tal fenômeno é um problema que acomete principalmente as populações de áreas subdesenvolvidas do mundo, especialmente crianças, sendo conceituado como um quadro de carência proteico-calórica no indivíduo acometido (OMS, 1962).

A desnutrição apresenta-se sob duas formas clínicas distintas, o marasmo e o Kwashiorkor. O Marasmo instala-se nos primeiros anos, preferencialmente no decorrer do primeiro ano. Tem sido frequentemente observado em crianças com seis meses de idade em fase de desmame precoce, quando passam a receber alimentação deficiente. O aparecimento é gradual e a evolução é lenta. A deficiência de crescimento bem como de

peso é acentuada, apresentando-se em torno de 60% do normal. Há significativa redução de gordura subcutânea e atrofia muscular (TORUN; CHEW, 1994).

Em relação aos pacientes portadores de Kwashiorkor, a manifestação da desnutrição ocorre após o primeiro ano de vida em que o paciente apresenta uma dieta não balanceada com calorias normais ou excessiva e deficiente em proteínas (ESCODA, 1989; CUPPARI, 2002; LIMA, 2003). Apresenta sintomatologia bem definida com quatro sinais sempre presentes: edema, atraso no crescimento, alterações psicomotoras com fraqueza muscular, alterações na pele e nos olhos (TORUN; CHEW, 1994).

Os estudos de Nascimento et al., (1990) e Alves et al., (2008) demonstraram que a restrição alimentar afeta o crescimento e diferenciação de tecidos e células. Na criança, quanto mais precoce a desnutrição, maior a severidade dos efeitos, ocasionando maior gravidade e extensão dos danos em diferentes órgãos e sistemas corporais (PATRICIO et al., 1994; ALVES et al., 2008). Esses achados reforçam a importância da recuperação nutricional em fases iniciais da vida, visando o crescimento e o desenvolvimento normal dos tecidos (BAPTISTA, 2008).

De acordo com Recine e Radaelli (2001), um quadro de desnutrição pode apresentar caráter primário ou secundário, dependendo da causa que a promoveu. A causa primária ocorre quando a pessoa apresenta uma alimentação quantitativa ou qualitativamente insuficiente em calorias, proteínas e nutrientes, dessa forma não satisfazendo as necessidades energéticas do organismo. Já a forma secundária ocorre por fatores culturais (como crenças e tabus, onde as pessoas são privadas de certos alimentos) e por fatores socioeconômicos, onde pessoas provenientes de famílias de baixa renda apresentam dificuldade em obter alimentos saudáveis e de alto valor nutritivo, além de apresentarem condições sanitárias precárias que também contribuem para o aparecimento de infecções, parasitoses e a desnutrição em si.

A condição de desnutrição proteica gera como consequência uma série de alterações na composição corporal e no funcionamento normal do organismo. Portanto, dentre as principais consequências se destacam: desaceleração, interrupção e até mesmo involução no crescimento; alterações sanguíneas, provocando, dentre elas, a anemia; alterações ósseas, tais como má formação; grande perda muscular e dos depósitos de gordura,

provocando debilidade física; queda imunitária e alterações psíquicas e psicológicas (RECINE e RADAELLI, 2001).

No âmbito da epidemiologia, o número de crianças desnutridas no Brasil representa 15,4% do total da população, ou seja, aproximadamente 2,5 milhões de indivíduos. A distribuição destas crianças no território nacional é desigual, caracterizando que, regiões com maior índice de pobreza e menor desenvolvimento sócio-econômico apresentam elevados índices de desnutrição, como é o caso das regiões norte e nordeste, que apresentam média de 25% de crianças desnutridas, enquanto a região sudeste e sul com média de 8,5% (MONTEIRO, 1995).

Dados do IFRPI (2010) mostram que a produção de alimentos não acompanha o ritmo de crescimento da população, principalmente em países subdesenvolvidos, o que determina um agravante para o problema da desnutrição. Portanto, a produção mundial de alimentos precisa aumentar 70% para alimentar a população mundial de 2050, estimada em nove bilhões. Além disso, os governos deverão ter políticas voltadas para agricultura e programas de assistência social, a fim de reforçar atividades que gerem renda para áreas mais pobres. Paulatinamente, as populações se recuperarão da vulnerabilidade da desnutrição e esse problema epidemiológico tenderá à normalização.

## **2.6. Desnutrição e o tecido muscular**

As proteínas são nutrientes necessários à homeostasia da célula e, se a deficiência proteica for acentuada, ocorrerá um desequilíbrio, o que acarretará alterações nos tecidos e estruturas dos órgãos, tais como redução no peso do conceito, modificações enzimáticas e bioquímicas (PATRÍCIO et al., 1984).

O tecido muscular é a reserva mais importante de proteína disponível no organismo, porém, este tecido se encontra consideravelmente reduzido nos casos de desnutrição grave em animais de experimentação, bem como em humanos. Durante o jejum parcial ou total, a proteína corporal é destruída para proporcionar aminoácidos, traduzindo-se na perda de massa corporal total (KRISHNAMURTHY et al., 1992).

A desnutrição pode ter início ainda na fase intrauterina causando efeitos que são diretamente proporcionais à fase em que se encontra o desenvolvimento embrionário. Quanto mais precoce ocorrer a desnutrição e mais tardio iniciar-se a recuperação nutricional, os efeitos e as consequências causadas na prole serão mais intensos e permanentes (PATRÍCIO et al., 1984). A resultante é a grande morbidade e mortalidade na fase de maior importância do desenvolvimento do organismo humano, a infância, acometendo particularmente, dentre outros, o tecido muscular, segmento de maior armazenamento protéico do organismo. Consistindo esse órgão no único capaz de converter energia química em energia mecânica, o inadequado suprimento de calorias e proteínas acarreta certamente alterações morfofuncionais no organismo (NASCIMENTO, 1990).

Pesquisas realizadas em ratos, cães e macacos, com baixo peso ao nascimento, demonstraram que a restrição proteica materna no início ou a partir da segunda metade da gestação, afeta o peso corporal e o número de fibras musculares da prole (NUNES et al., 2002).

Estudos relativos ao tamanho muscular em animais submetidos à desnutrição pós-natal revelaram que tal redução é atribuída principalmente à diminuição no volume das fibras (hipotrofia) e não ao número total (hipoplasia) de fibras do tecido. Já na desnutrição intrauterina, há evidências de que ocorra o fenômeno de hipoplasia (ROWE, 1968; STRICKLAND, 1975; ALVES, 2008).

Nos seres humanos, uma consequência da subnutrição é a progressiva perda das reservas corporais de musculatura e de tecido adiposo, com hipotrofia de diversos órgãos, incluindo rins, intestinos e órgãos linfóides (MCMAHON & BISTRIAN, 1990).

O tecido muscular esquelético é sensível à desnutrição proteica por ser um potente reservatório, portanto, quando há déficit proteico na dieta, este tecido torna-se alvo de depleção, ocasionando alterações nas fases de crescimento e diferenciação das fibras musculares (NASCIMENTO et al., 1990; OLIVEIRA et al. 1999).

Os músculos se apresentam diminuídos em seu volume, delgados e encurtados, por atrofia das miofibrilas nos dois tipos clínicos da desnutrição; já o tono muscular é diferente conforme o tipo de desnutrição: no subnutrido (marasmático) ele está aumentado, oferecendo resistência à movimentação passiva, enquanto que no Kwashiorkor (desnutrição intermediária) os músculos encontram-se hipotônicos, com movimentação ativa muito

escassa e não oferecendo resistência alguma à movimentação passiva, chegando, às vezes, a simular paralisia. Essas alterações musculares podem condicionar posições viciosas de articulações, às quais terminam em deformidades não hereditárias, tais como: pés chatos, alterações no tórax e joelhos e desvio da coluna vertebral (SANTOS, 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Verificar experimentalmente se o protocolo de imobilização articular causa alterações no tecido músculoesquelético de animais controles, obesos e desnutridos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Considerando os animais perante o protocolo de imobilização articular e nas condições nutricionais propostas, propusemo-nos a:

- Avaliar se a imobilização afeta o consumo alimentar e verificar o peso corpóreo e a massa muscular dos animais nessas condições;
- Avaliar experimentalmente a atividade locomotora;
- Avaliar os aspectos histomorfométricos do tecido ósseo (tíbia) e dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior;
- Quantificar o nível sérico da enzima Creatina Quinase (CK);
- Determinar a quantidade de glicogênio no tecido muscular;
- Avaliar por meio de zimografia a expressão das metaloproteinase dois (MMP-2) e metaloproteinase nove (MMP-9) no tecido muscular.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Delineamento experimental

Para a realização da experimentação e manipulação animal foram respeitados os ‘Princípios Éticos na Experimentação Animal’, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI N° 11.794, de 08 de outubro de 2008, e DECRETO N° 6.899 de 15 de julho de 2009.

O projeto (protocolo N° 2872-1) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/Unicamp – em 04 de outubro de 2012.

A pesquisa foi caracterizada como um estudo controlado do tipo analítico experimental no qual foram selecionados 60 camundongos machos adultos da linhagem C57/BL6 J/Unib. Os animais foram obtidos por meio de fornecedor cadastrado do biotério CEMIB/UNICAMP e mantidos em gaiolas plásticas padrão, com livre acesso à água e ração específica para cada grupo. Foram mantidos apenas dois animais por gaiola, com o propósito de manter uma boa adaptação dos mesmos e submetidos a condições padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de 22 °C.

### 4.2. Animais da pesquisa

Os 60 animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, conforme descritos abaixo:

- **Controle (GC) (N=15):** após o desmame receberam uma dieta normoproteica e normolipídica por todo o período experimental e ao final foram eutanasiados (105 dias).

- **Controle Imobilizado (GCI) (N=15):** após o desmame receberam uma dieta normoproteica e normolipídica por todo o período experimental (105 dias), sendo que, no 91º dia os animais foram submetidos ao procedimento de imobilização articular do membro pélvico direito, permanecendo assim por 14 dias até serem eutanasiados ao final do experimento.
- **Obeso Imobilizado (GOI) (N=15):** após o desmame receberam uma dieta normoproteica e normolipídica até completarem 45 dias de vida, e em seguida receberam dieta hiperlipídica até o final do experimento (105 dias). No 91º dia os animais foram submetidos ao procedimento de imobilização articular do membro pélvico direito, permanecendo assim por 14 dias até serem eutanasiados ao final do experimento.
- **Desnutrido Imobilizado (GDI) (N=15):** após o desmame receberam uma dieta hipoproteica por todo o período experimental (105 dias), sendo que, no 91º dia os animais foram submetidos ao procedimento de imobilização articular do membro pélvico direito, permanecendo assim por 14 dias até serem eutanasiados ao final do experimento.

Os grupos imobilizados foram mantidos nessa posição por meio de uma técnica adaptada para o uso em camundongos. Os animais permaneceram dessa forma durante um período de 14 dias, tempo considerado hábil para indução da atrofia muscular, conforme estudos recentes (BERTOLINI et al., 2010; SANTOS-JUNIOR et al., 2010; ALVES et al., 2013).

### 4.3. Técnica de imobilização

Após avaliarmos diversos métodos de imobilização, chegamos ao consenso de utilizarmos uma técnica com metodologia simplificada (SANTOS-JUNIOR, 2010), a qual foi adaptada em nosso estudo para o uso em camundongos. A técnica consistiu em anestésiar os animais com Cetamina 50mg/Kg e Xilasina 8mg/Kg de peso do animal, posteriormente, o membro pélvico direito foi tricotomizado e imobilizado de forma prévia

com micropore hipoalergênico (Cremer). Em seguida, a imobilização foi realizada por tiras de esparadrapo (Cremer) impermeável (3 cm de largura), que inclui a pelve, quadril, joelho (ambos em extensão) e o tornozelo (em flexão plantar). Na sequência, uma tira de faixa gessada (Cremer) (2 cm de largura e 10 cm de comprimento) foi umedecida e aplicada sem muita pressão de torque em volta do membro do animal, com o propósito de impedir que o mesmo destrua a imobilização feita com o esparadrapo (Figura 1). A imobilização foi verificada diariamente, substituída quando danificada e mantida pelo período de duas semanas (14 dias). Posteriormente ao procedimento de imobilização articular os animais foram mantidos individualmente em gaiolas plásticas. Este procedimento evitou que os animais brigassem entre si e com isso danificassem a imobilização esparadrapo/gessada.

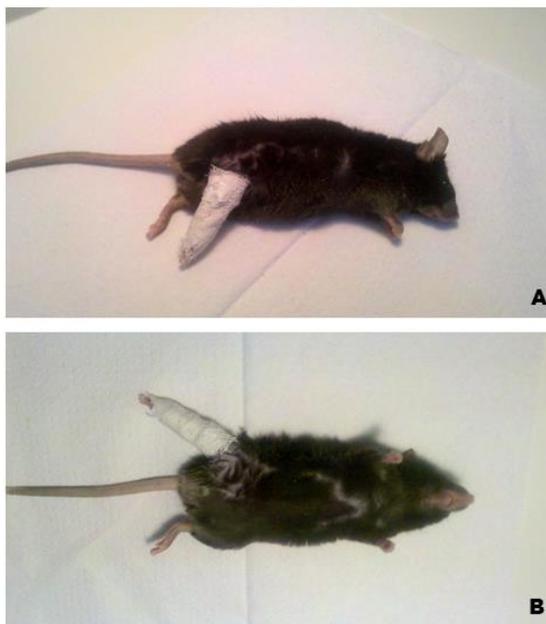


Figura 1. Protocolo de imobilização articular do membro pélvico dos animais. A= plano lateral direito; B= plano ventral.

#### **4.4. Indução da obesidade e desnutrição nos animais**

Previamente aos experimentos os animais passaram por alguns procedimentos a fim de desenvolverem o quadro de obesidade e desnutrição proteica, caracterizando, assim, os

grupos experimentais (De SOUZA et al., 2007; FILIPUTTI et al., 2008; BATISTA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012; CAPPELLI et al., 2013; VETTORAZZI et al., 2014).

Para a indução da obesidade, logo após o desmame, os animais receberam uma dieta normoproteica e normolipídica até completarem 45 dias de vida. Em seguida, receberam dieta contendo alto teor de gordura (34% dieta hiperlipídica) até o final do experimento (105 dias).

Para a indução da desnutrição proteica, os animais receberam uma dieta hipoproteica contendo 6% de proteína logo após o desmame. A ingestão dessa dieta permaneceu até o final do período experimental (105 dias).

A composição nutricional das dietas segue em anexo (anexo I).

O índice de Lee, peso total dos animais, peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal foram utilizados como variáveis para avaliação e caracterização dos grupos obesos e desnutridos.

Os animais tiveram o peso corpóreo e o consumo energético monitorados em dois períodos, um pré e outro pós-imobilização. Os animais foram pesados diariamente na semana que antecedeu o procedimento de imobilização articular. Dessa forma foi mensurado o peso médio dos animais pré-imobilização. A mesma conduta foi seguida na semana seguinte à imobilização, mensurando-se assim o peso médio dos animais pós-imobilização. Igualmente, o consumo alimentar foi avaliado, obtendo-se valores do consumo pré e pós-imobilização. Estes procedimentos foram realizados em todos os grupos experimentais.

#### **4.5. Avaliação da atividade locomotora**

Com o intuito de avaliar se a metodologia de imobilização proposta na presente pesquisa afeta a locomoção dos animais dentro do ambiente experimental, foi empregado o teste de avaliação da atividade locomotora como descrito a seguir.

Utilizou-se caixas de atividade de campo aberto (Multitake Cage® LE001 PH) em policarbonato acrílico transparente (42,5 x 30,5 cm), com feixes de raios infravermelho

dispostos em diferentes alturas, o que possibilitou a detecção e contagem automática da locomoção do animal, tempo de imobilidade e o comportamento de levantar-se nas patas posteriores (Figura 2). O controle das sessões experimentais e o registro dos dados foram feitos em um notebook conectado às interfaces das caixas. Para isso, foi utilizado o software Compulse® e Actitrack (Pan Lab/Harvard instruments, Barcelona, Espanha) acoplado ao sistema.

Com a finalidade de adaptação do animal, os mesmos foram colocados individualmente na caixa teste e permaneceram por um período de 24 horas, antes de iniciar o teste. Em seguida o sistema de coleta dos dados foi ligado e os animais foram monitorizados pelo aparelho durante um período de 24 horas. Os mesmos animais foram avaliados em períodos diferentes (pré e pós-imobilização). Os animais de todos os grupos passaram por este procedimento.



Figura 2: Equipamentos para o teste de avaliação da atividade locomotora dos animais.

#### **4.6. Eutanásia dos animais**

Ao final dos tratamentos experimentais os animais foram anestesiados por meio da inalação de dióxido de carbono. Em seguida, foram sacrificados por decapitação e

posteriormente realizou-se a dissecação da tíbia e dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior. Os músculos e a tíbia foram pesados e mensurados. Uma amostra sanguínea foi coletada diretamente do ventrículo esquerdo e armazenada em eppendorf de 1,5 ml sem anticoagulante. Posteriormente o sangue foi centrifugado para separação de seus derivados e então o soro foi coletado para análises bioquímicas. Em seguida os tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal foram dissecados, isolados e posteriormente pesados em balança analítica (Shimadzu®, modelo AUW220D).

#### **4.7. Quantificação sérica da enzima Creatina Quinase (CK)**

O sangue dos animais foi coletado no momento da eutanásia. Após a toracotomia e exposição do coração, uma seringa foi introduzida no ventrículo esquerdo do animal e um volume de sangue coletado e transferido para um eppendorf de 1,5 ml. Em seguida, o sangue foi centrifugado (Sigma®, Modelo 3-18k) nas seguintes condições: 8000 RPM, 4°C por 15 minutos, sendo o sobrenadante (soro) utilizado para análise.

Para quantificação da CK foi utilizado o kit CK-NAC UV AA líquida (Wiener Lab®) com método UV otimizado (IFCC). As absorbâncias das amostras foram lidas a 37°C utilizando-se o analisador clínico de acesso randômico (CM200 – Wiener Lab®) que trabalha com um software integralmente desenvolvido para Windows XP ®.

#### **4.8. Preparo do osso e dos músculos para a técnica de Hematoxilina e Eosina**

Após a dissecação e pesagem, os músculos gastrocnêmio e tibial anterior foram transferidos para um recipiente e fixados em solução formalina 10% tamponada durante 24 horas a 22°C. Em seguida, as amostras foram lavadas, seguindo para desidratação em banhos de álcool, posterior diafanização com banhos de xilol e um processo de inclusão em parafina rotineiro (KIERNAN, 1981).

A tíbia passou pelos mesmos procedimentos, diferenciando-se apenas pela realização de um procedimento de descalcificação com EDTA (0,01 mol/L), após a fixação. Devemos ressaltar que a região periarticular distal da tíbia foi utilizada para as análises histomorfométricas.

Após estas etapas, foram realizados cortes transversais de 7 $\mu$ m de espessura com um micrótomo (Leica®, modelo RM2125RT). Para a coloração em hematoxilina-eosina as lâminas foram mergulhadas em solução de Hematoxilina por quarenta segundos, lavadas em água corrente, e posteriormente mergulhadas em Eosina por trinta segundos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em uma sequência alcoólica (70, 80, 95, 100%), mergulhadas em xilol e montadas com lamínulas em Bálsamo do Canadá. Esta coloração nos permite uma visualização geral de todo o tecido (KIERNAN, 1981).

#### **4.9. Estudos histomorfométricos**

Para o estudo histomorfométrico das imagens, estas foram capturadas por meio do microscópio óptico (Olympus modelo BX53) e de uma câmera (Olympus modelo QCOLLOR5) acoplada a este. Todas as imagens foram capturadas na objetiva de 10X para os músculos e na objetiva de 4X para a tíbia.

O estudo histomorfométrico dos músculos quantificou a área e o diâmetro de Feret das fibras musculares com auxílio de um Software (Image\_J). As áreas e diâmetros de 225 fibras dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior, por animal, foram assim obtidas: 15 fibras por campo, sendo três campos por corte, num total de cinco cortes por animal. Utilizou-se um retículo quadriculado para delimitar o campo e, a escolha das 15 fibras foi feita aleatoriamente. Foram quantificadas as fibras musculares de quatro (4) animais por grupo, totalizando 900 fibras para cada grupo. A fim de se obter uma quantificação morfométrica correta e confiável das variáveis propostas, um segundo observador analisou as mesmas variáveis em 10% do total das lâminas e seus resultados foram comparados com os do responsável pela pesquisa.

O estudo histomorfométrico da tíbia quantificou por meio do Software (Image\_J) os seguintes parâmetros: espessura da camada cortical, diâmetro do canal medular e número de osteócitos. Foram feitos quatro cortes de cada amostra. Em cada corte foram mensurados cinco pontos diferentes para a espessura da camada cortical, cinco campos visuais aleatórios para contagem dos osteócitos e o diâmetro do canal medular foi mensurado no seu total. Todas as variáveis foram quantificadas em quatro animais por grupo (N=4).

#### **4.10. Determinação do conteúdo de glicogênio muscular**

Após os tratamentos experimentais, para realizarmos a dosagem de glicogênio, um ‘pool’ das amostras dos músculos (35-40 mg) foi inicialmente digerido em uma solução de KOH (30% c/ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em temperatura de 100°C por 30 minutos. Posteriormente, o glicogênio foi precipitado a partir da passagem por etanol 95% a frio. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3.100 rpm durante 30 minutos. O glicogênio precipitado foi submetido a hidrólise ácida na presença de fenol 5% e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%, segundo a proposta de Siu et al., (1970). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm. A análise por absorvância foi feita em duplicata para cada amostra. Os resultados foram apresentados em g/100g de tecido.

#### **4.11. Zimografia das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9**

O presente trabalho optou por quantificar apenas as isoformas ativas das metaloproteinases dois (MMP-2) e nove (MMP-9) no tecido muscular. Os músculos gastrocnêmio e tibial anterior foram analisados de forma individual. A técnica de zimografia para metaloproteinases foi realizada pelos seguintes procedimentos:

1- Extração: o tecido congelado (músculos) foi triturado e em seguida homogeneizado com tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 7.4, NaCl 0,2 M, Triton X-100 0,1%, CaCl<sub>2</sub> 10mM e inibidor de protease 100µl /10ml), na proporção de 30mg de tecido/100µl de tampão de extração. A extração foi realizada por 2 horas em banho de gelo sob agitação. Após a extração, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm (4°C) por 20 minutos (Centrifuga Sigma®, Modelo 3-18k). O sobrenadante foi coletado e armazenado. O precipitado foi ressuspendido com 1/3 do volume do tampão utilizado na primeira extração, a solução foi aquecida por 5 minutos a 60°C. Novamente foi feita uma centrifugação a 4000 rpm (4°C) por 20 minutos e o sobrenadante coletado. Os dois produtos das duas extrações foram então misturados. Uma parte do extrato final foi separada para posterior dosagem de proteínas totais através do método de Bradford (1976).

Para realização do método de Bradford (1976) foram utilizadas alíquotas dos extratos de zimografia. Como padrão foi empregado albumina bovina sérica (BSA). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo 8452 A Diode Array da HP®) no comprimento de onda de 595 nm.

2- Aplicação das amostras: a amostra foi aplicada usando-se a proporção de 2µl da amostra/1µl do tampão de amostra (5,5ml água destilada, 1,25ml Tris-HCL 0,5M pH 6.8, 0,3ml glicerol, 0,2ml azul de bromofenol - 0,5% e 0,1g SDS-10%), em gel de Poliacrilamida 10% e 0,1% de gelatina. Foram aplicados 0,5 µl de amostra nos géis. A amostra mais o tampão foram incubados a 60°C por 5 minutos.

3- Eletroforeses (100 v aproximadamente 01h30minh): foram realizadas em condições não redutoras a 4°C. Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes de 15 min em Triton X-100 para retirar o SDS. Após incubação overnight a 37°C com tampão de incubação, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue por aproximadamente 2h, e descorado (solução metanol 30% e ácido acético 10% em água). Finalmente, foi colocado na solução encolhedora (metanol 30% e glicerol 3%). Após a eletroforese o gel foi fotografado e verificado por exposição à luz ultravioleta em transiluminador GBOX Chemi HR (Syngene®, Frederick, MD, EUA) e em seguida as imagens foram analisadas por meio de um software (Scion Image), onde foram realizadas a densitometria de bandas no gel de zimografia.

#### 4.12 Tratamentos estatísticos

Para a análise estatística foi utilizado inicialmente o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em caso de normalidade dos dados, foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) e teste “post hoc” de Tukey para comparações múltiplas. Esta forma de análise foi aplicada nas seguintes variáveis: Peso dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior, peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal, índice de Lee, enzima CK sérica, glicogênio intramuscular, histomorfometria da tibia, zimografia das metaloproteinases.

Quando não houve normalidade dos dados, a escolha foi pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do “post hoc” de Dunns de comparações múltiplas. Esta forma de análise foi aplicada para as seguintes análises: área e diâmetro das fibras musculares.

Para a análise da atividade locomotora, peso corpóreo e consumo alimentar dos animais antes e depois da imobilização, foram utilizados ANOVA two way, com o objetivo de identificar se a condição de imobilização articular afeta a atividade locomotora, peso e o consumo alimentar dos animais.

A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ , utilizando como recurso de análise o programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia USA, ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização dos grupos Controle, Obeso e Desnutrido.

Antes do início experimental proposto para a pesquisa, os animais passaram por períodos padronizados de ingestão de dietas específicas a fim de que fossem caracterizados os grupos experimentais. Para verificação da efetividade da metodologia foram levados em conta o peso total (g) e o consumo alimentar dos animais, antes e depois da imobilização, o peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal (mg) após sacrifício, e o índice de Lee, calculado, ao final do experimento, a partir da relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento nasoanal do animal. Devemos ressaltar que o índice de Lee é homólogo ao índice de massa corporal (IMC) em humanos (NOVELLI, et.al., 2007).

Os resultados das comparações do peso corporal total (g) entre os grupos, antes e após a imobilização, apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Quando comparados ao 91º dia (antes da imobilização), o GOI apresentou peso (g) 16,3% maior em relação ao GC, enquanto o GDI apresentou peso de 6,8% menor que GC. Já o GCI não apresentou diferença estatística quando comparado ao GC.

Em comparação feita no dia do sacrifício (105º dia) os grupos GCI e GDI apresentaram respectivamente uma redução de 8,1% e 17,5% no peso (g) quando comparados ao GC. Já o GOI não apresentou diferença significativa quando comparado ao GC.

Considerando-se o fator imobilização, todos os grupos que passaram por esse procedimento (GCI, GOI, GDI) apresentaram redução no peso (g) quando comparados entre si no período pré-imobilização (91º dia), conforme valores absolutos na Figura 3.

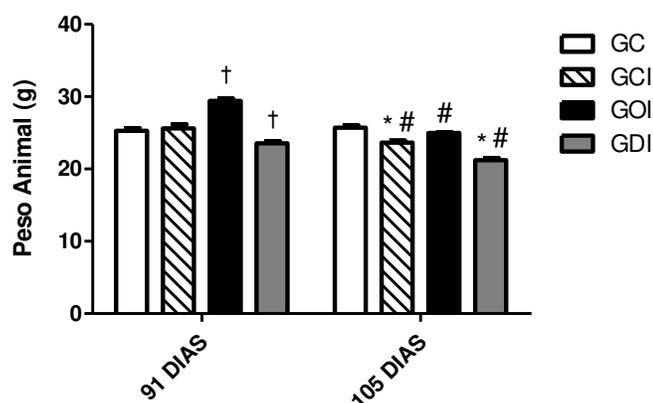


Figura 3: Medidas do peso corpóreo dos animais (g) antes e após o procedimento de imobilização. GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado; † diferente do GC (91 dias); \* diferente do GC (105 dias); # diferentes dentro do mesmo grupo quando comparados o período pré e pós-imobilização. Valores expressos na forma de media  $\pm$  erro padrão, ANOVA two way, com  $p < 0,05$ .

Os resultados mostraram que os animais do GOI consumiram quantidade menor de dieta (12,3% e 17,5%), quando comparados ao GC-91<sup>o</sup> dia e GC-105<sup>o</sup> dia, respectivamente. Já o GDI teve aumento de 11% na ingestão da dieta quando comparado ao GC (105<sup>o</sup> dia), conforme exposto em valores absolutos na Figura 4.

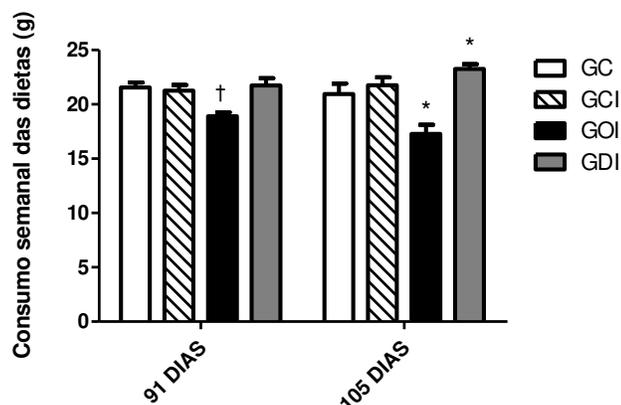


Figura 4: Consumo semanal das dietas (g) antes e após o procedimento de imobilização. GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado; † diferente do GC (91 dias); \* diferente do GC (105 dias). Valores expressos na forma de media  $\pm$  erro padrão, ANOVA two way, com  $p < 0,05$ .

A análise do índice de Lee apontou diferença estatisticamente significativa para todos os grupos no momento do sacrifício, o que mostra uma redução de GCI 4,2%, GOI 2,2% e GDI 4,7% quando comparados ao GC. Já nas comparações entre os grupos imobilizados, o índice de Lee do GOI se apresentou 2,1% maior em comparação ao GCI.

Os dados relacionados ao tecido adiposo retroperitoneal apontaram diferença estatisticamente significativa. Os valores revelaram uma quantidade 42,33% maior na reserva adiposa no GOI quando comparado com o GC e, uma quantidade de 67,93% maior quando comparado ao GCI. O grupo GDI apresentou redução na reserva adiposa retroperitoneal em relação aos grupos GC e GCI, porém, sem diferença significativa. Os resultados observados no tecido adiposo perigonadal apontaram que o GOI apresentou reserva adiposa 23,1% maior que o GC e 27,3% maior que o GCI. Já no GDI foi observada uma taxa 32% menor da quantidade de tecido adiposo em relação ao GC e 29,6% menor em relação ao GCI. Os dados estão expostos em valores absolutos na Tabela 1.

Tabela 1: Índice de Lee, peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal (mg) avaliados de acordo com a dieta específica ingerida por cada grupo. GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado;

<b>Grupos</b>	<b>Índice de Lee (Unidade arbitrária)</b>	<b>Tecido adiposo retroperitoneal (mg)</b>	<b>Tecido adiposo perigonadal (mg)</b>
<b>GC</b>	0,3240±0,0012	85,57±5,8	254,0±7,8
<b>GCI</b>	0,3103±0,0013*	72,53±1,9	245,6±12,1
<b>GOI</b>	0,3169±0,0014*#	121,8±8,1*#	312,7±14,7*#
<b>GDI</b>	0,3089±0,0010*	67,90±4,6	172,8±14,1*#

NOTA: \*valores estatisticamente significativos em relação ao grupo GC; #valores estatisticamente significativos em relação ao GCI (p<0,05). Valores expressos na forma de média ± erro padrão, Anova One Way com post hoc de Tukey de comparações múltiplas com p<0,05.

## 5.2. Análise da atividade locomotora

Os animais foram avaliados durante o período de 24 horas, sendo as primeiras 12 horas no período claro (diurno) e as outras 12 restantes, no período escuro (noturno). Os

resultados da análise da atividade locomotora diurna entre os grupos pré-imobilizados (91º dia) e immobilizados (105º dia), apresentaram menores variações entre si. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados esses grupos. Também não foram verificados valores estatisticamente significativos quando comparados os grupos dentro do mesmo período (91 ou 105 dias). A Figura 5 mostra os valores absolutos da atividade locomotora diurna.

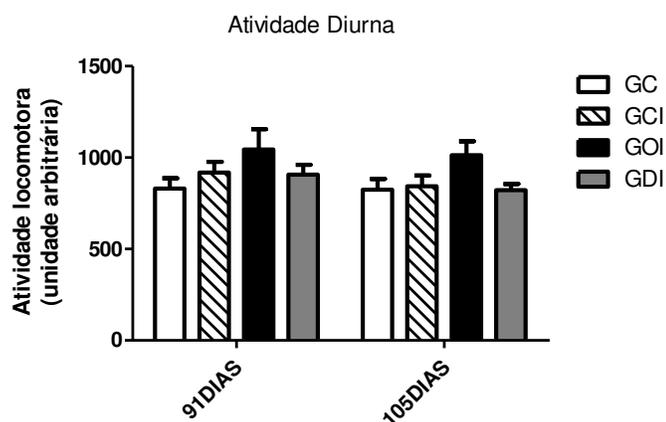


Figura 5: Atividade locomotora diurna dos animais antes e durante o período de imobilização. GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado; Valores expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão, ANOVA two way, com  $p < 0,05$ . Neste caso não foram verificadas diferenças estatísticas significantes.

Os resultados da análise da atividade locomotora noturna no período pré-imobilização apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Quando comparados no 91º dia (pré-imobilização) o GOI apresentou atividade locomotora 35,3% menor em relação ao GC. Na mesma observação, o GDI apresentou atividade de 41,4% menor que GC, enquanto, o GCI não apresentou diferença estatística quando comparado ao GC.

Em comparação feita no período em que os animais se apresentavam immobilizados (105º dia), os grupos GCI, GOI e GDI apresentaram, respectivamente, uma redução de 54,1%, 54,9% e 52,9% na atividade locomotora quando comparados ao GC. Já na comparação entre os grupos immobilizados não houve diferença estatística significativa.

Levando em consideração o fator imobilização, os grupos (GCI, GOI e GDI), apresentaram atividade locomotora reduzida em 53,2%, 28% e 16,9% quando comparados com o período pré-imobilização (91 dias), conforme Figura 6.

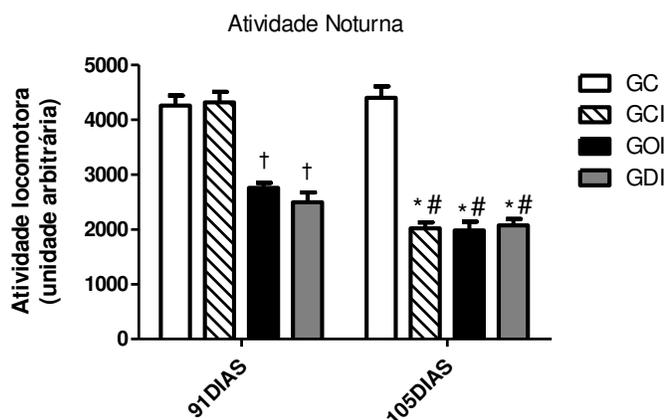


Figura 6: Atividade locomotora noturna dos animais antes e durante o período de imobilização. GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado; † diferente do grupo C (91 dias); \* diferente do GC (105 dias). # diferentes dentro do mesmo grupo quando comparados o período pré-imobilizado com o pós-imobilizado. Valores expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão, ANOVA two way, com  $p < 0,05$ .

### 5.3. Análise histomorfométrica e peso (mg) da massa muscular.

Os dados histomorfométricos e o peso (mg) do músculo gastrocnêmio estão relatados em valores absolutos na Tabela 2 e de modo percentual para melhor compreensão das variações no decorrer do texto.

Com relação à área de fibra do músculo gastrocnêmio (Figura 7), foram encontradas diferenças estatísticas entre todos os grupos analisados. A área de fibra do GCI mostrou-se 42,7% menor que o grupo controle, ao passo que os grupos GOI e GDI apresentaram respectivamente área de fibra 49,9% e 59,6% menores em relação ao GC. Quando comparados apenas os grupos imobilizados, observamos uma diferença estatística na área de fibra muscular dos grupos GOI e GDI quando comparados ao GCI. A área de fibra do

GOI se apresentou 12,4% menor do que o GCI, da mesma forma que o GDI demonstrou área de 29,4% quando comparado com o GCI.

Estudando o diâmetro de Feret das fibras musculares do gastrocnêmio (Figura 7) verificamos que os grupos imobilizados GCI, GOI e GDI demonstraram, respectivamente, uma diminuição de 20,1%, 29,1% e 36% no diâmetro de suas fibras quando comparados ao GC. Quando analisamos, exclusivamente, os grupos imobilizados, verificamos uma diminuição de 11,2% no GOI e 19,2% no GDI quando comparados ao GCI.

Os dados relativos à massa muscular do gastrocnêmio foram analisados e exibiram diferenças estatísticas entre grupos. O GC apresentou peso de massa muscular 10,1% maior quando comparado ao GCI. No entanto, GOI e GDI expressaram valores 5,9% e 23,1% menores em relação ao GC. Na observação entre os grupos imobilizados, apenas o GDI apresentou redução de 14,5% da massa muscular em relação ao GCI.

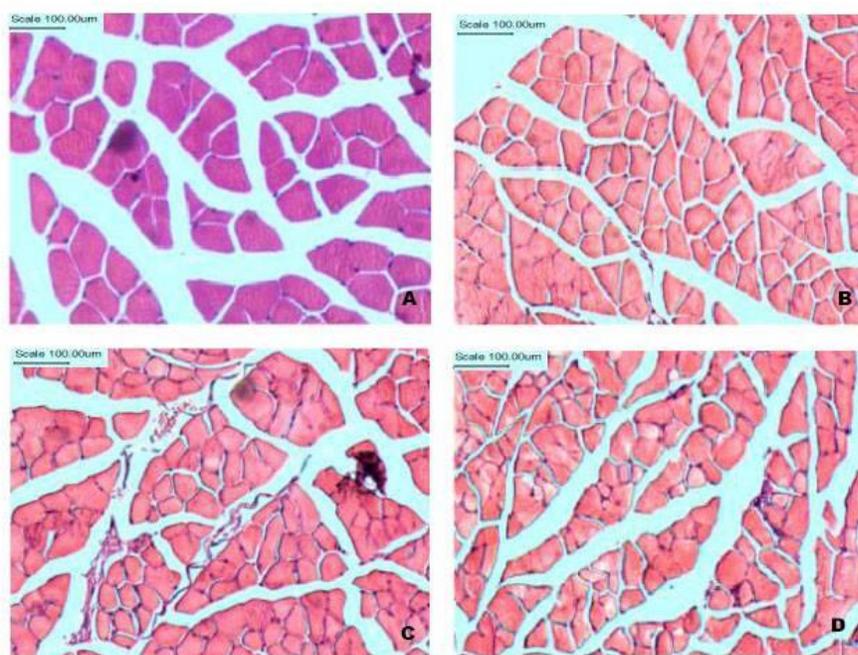


Figura 7: Cortes histológicos para determinação da área e diâmetro de Feret das fibras do músculo gastrocnêmio. A= Grupo Controle; B= Grupo Controle Imobilizado; C= Grupo Obeso Imobilizado; D= Grupo Desnutrido Imobilizado.

Tabela 2: Massa muscular (g), área ( $\mu\text{m}^2$ ) e diâmetro de Feret ( $\mu\text{m}$ ) das fibras do músculo gastrocnêmio. GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado;

Grupos	Massa muscular (mg)	Área de Fibras $\mu\text{m}^2$	Diâmetro de Fibras $\mu\text{m}$
GC	131,9 $\pm$ 1,3	1766 $\pm$ 11,3	63,1 $\pm$ 0,3
GCI	118,6 $\pm$ 1,5*	1011 $\pm$ 10,4*	50,4 $\pm$ 0,3*
GOI	124,1 $\pm$ 1,6*	885,3 $\pm$ 8,9*#	44,7 $\pm$ 0,3*#
GDI	101,4 $\pm$ 1,3*#	714 $\pm$ 5,6*#	40,4 $\pm$ 0,2*#

NOTA: \*valores estatisticamente significativos em relação ao grupo GC; #valores estatisticamente significantes em relação ao grupo GCI ( $p < 0,05$ ). Valores expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão, Teste de Kruskal-Wallis com o post hoc de Dunns de comparações múltiplas com  $p < 0,05$ .

O músculo tibial anterior seguiu a mesma variação do gastrocnêmio nas análises da área e diâmetro das fibras musculares (Figura 8) apresentando diferenças significativas na maioria das comparações entre os grupos estudados.

Os valores encontrados relataram uma diminuição de 44,2%, 46,6% e 52,8% da área de secção transversa dos grupos GCI, GOI e GDI respectivamente, quando comparados ao GC. Na verificação entre os grupos imobilizados o GOI apresentou diminuição de 4,2% e o GDI de 15,3% quando comparados ao GCI.

O estudo do diâmetro de Feret das fibras musculares do tibial anterior proporcionou a observação de que os grupos GCI, GOI e GDI apresentaram respectivamente uma diminuição de 24,1%, 25,9% e 31,2% em relação ao GC. Já a análise entre os grupos imobilizados apontou para uma redução de 2,3% do GOI e 9,3% do GDI, ambos, em relação ao GCI.

Na observação da massa muscular (g) do tibial anterior, apenas o GDI apresentou redução significativa de 10,9%, em relação ao GC, bem como em relação ao GCI. Os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados entre si. Os dados com os valores absolutos estão expressos na Tabela 3.

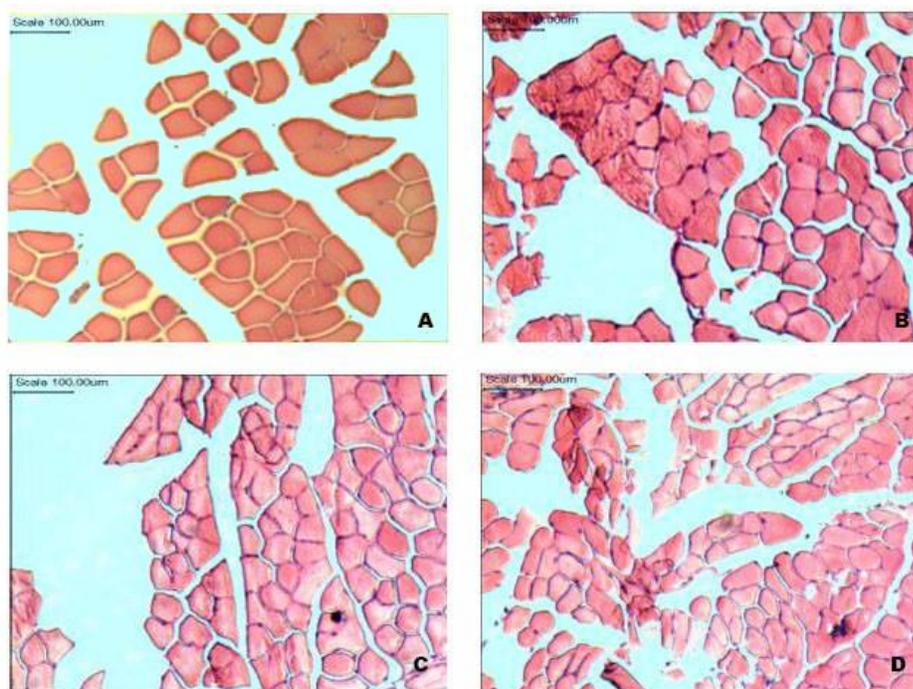


Figura 8: Cortes histológicos para determinação da área e diâmetro de Feret das fibras do músculo tibial anterior. A= Grupo Controle; B= Grupo Controle Imobilizado; C= Grupo Obeso Imobilizado; D= Grupo Desnutrido Imobilizado.

Tabela 3: Massa muscular (mg), área ( $\mu\text{m}^2$ ) e diâmetro de Feret ( $\mu\text{m}$ ) de fibras do músculo tibial anterior. GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado;

Grupos	Massa muscular (mg)	Área de Fibras $\mu\text{m}^2$	Diâmetro de Fibras $\mu\text{m}$
<b>GC</b>	40,5±1,1	1225±11,7	52,2±0,4
<b>GCI</b>	40,5±0,9	682,6±5,2*	39,6±0,3*
<b>GOI</b>	41,5±0,7	653,9±5,9*#	38,7±0,3*#
<b>GDI</b>	36,1±1,1*#	578,4±6,9*#	35,9±0,2*#

NOTA: \*valores estatisticamente significativos em relação ao GC; #valores estatisticamente significativos em relação ao GCI ( $p < 0,05$ ). Valores expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão, Para o peso corpóreo foi utilizado Anova One way com o post hoc de Tukey; Para as demais variáveis foi utilizado teste de Kruskal-Wallis com o post hoc de Dunns de comparações múltiplas com  $p < 0,05$ .

#### 5.4. Análise histomorfométrica do tecido ósseo (tíbia)

O estudo envolvendo a tíbia dos animais apresentou diferenças estatísticas em todas as variáveis analisadas. Quantificando o número de osteócitos podemos observar que os grupos GCI, GOI e GDI apresentaram, respectivamente, quantidades 7,6%, 7,7% e 7,9% menores quando comparados ao GC. Na comparação entre os grupos imobilizados não houve diferença estatística.

Analisando a espessura da camada cortical óssea, os valores encontrados demonstraram que os GCI e GDI diferiram significativamente quando comparados ao GC. Já na análise dos grupos imobilizados evidenciamos que o GDI apresentou redução significativa em comparação ao GCI.

Os valores encontrados referentes ao diâmetro do canal medular apresentaram diferenças estatísticas em todos os grupos quando comparados ao GC. Quando foram comparados apenas os grupos imobilizados, o GOI e o GDI apresentaram, respectivamente, valores 20,6% e 20,7% menores quando comparados ao GCI. Os valores absolutos das análises da tíbia estão expressos na tabela 4.

Tabela 4: Número de osteócitos, espessura da camada cortical ( $\mu\text{m}$ ) e diâmetro do canal medular da tíbia ( $\mu\text{m}$ ). GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado;

Grupos	Nº de Osteócitos	Espessura da cortical	Diâmetro do canal
		$\mu\text{m}$	medular $\mu\text{m}$
<b>GC</b>	23,69±0,56	203,1±1,5	663,6±9,1
<b>GCI</b>	21,89±0,46*	195,5±2,1*	720,7±9,9*
<b>GOI</b>	21,87±0,35*	196,7±1,4	869,6±5,2*#
<b>GDI</b>	21,82±0,36*	164,6±2,1*#	870,1±18,6*#

NOTA: \*valores estatisticamente significativos em relação ao GC; #valores estatisticamente significantes em relação ao GCI ( $p < 0,05$ ). Valores expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão, Anova One Way com post hoc de Tukey de comparações múltiplas com  $p < 0,05$ .

### 5.5. Quantificação sérica da enzima Creatina Quinase – CK

O resultado da dosagem sérica da enzima creatina quinase (CK) apresentou diferença estatisticamente significativa em todos os grupos imobilizados quando comparados ao GC. A CK se apresentou aumentada em 78,9% no GCI quando comparado ao GC. Todavia, os grupos GOI e GDI apresentaram um aumento de 80% e 92,1%, respectivamente, quando comparados ao GC. Não houve diferença estatística quando comparados os grupos imobilizados entre si. Na Figura 9 são apresentados os valores absolutos.

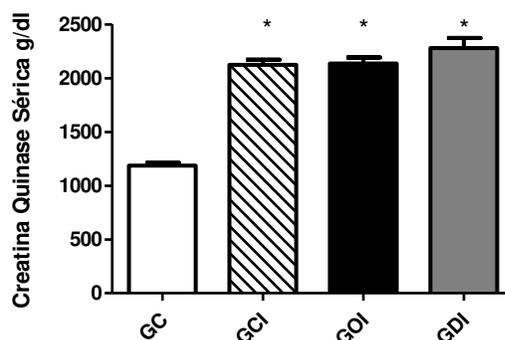


Figura 9: Dosagem sérica da enzima creatina quinase (CK). GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado; \* diferente do GC. Valores expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão, Anova One Way com post hoc de Tukey de comparações múltiplas com  $p < 0,05$ .

### 5.6. Dosagem do glicogênio intramuscular

Na análise da dosagem de glicogênio intramuscular verificaram-se três situações distintas. A primeira foi o aumento da quantidade relativa de glicogênio intramuscular nos GCI e GOI em relação ao GC, entretanto, sem diferença estatística. A segunda, uma redução desta dosagem no GDI em relação ao GC, também sem resultado estatisticamente significativo. A terceira foi que, quando comparados os grupos imobilizados, o GDI

apresentou glicogênio intramuscular reduzido em 68,1% e 70,9% quando comparado ao GCI e GOI, respectivamente. Na Figura 10 são apresentados os valores absolutos.

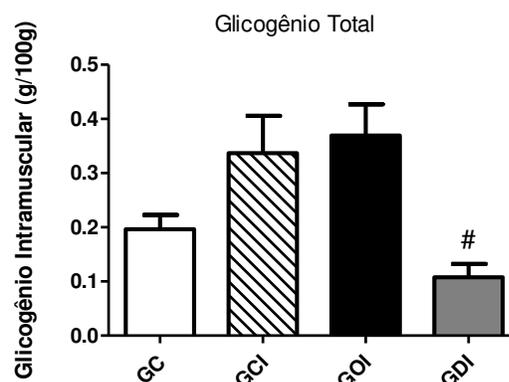


Figura 10: Análise conjunta da dosagem de glicogênio intramuscular dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior. GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado; # diferente dos grupos GCI e GOI. Valores expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão, Anova One Way com post hoc de Tukey de comparações múltiplas com  $p < 0,05$ .

### 5.7. Zimografia das enzimas MMP-2 e MMP-9

A técnica de zimografia permitiu analisar isoladamente os músculos gastrocnêmio e tibial anterior e apresentou diferenças estatísticas significativas em ambos os músculos quando comparados os diferentes grupos. No presente estudo quantificamos apenas as isoformas ativas da MMP-2 e da MMP-9.

Os resultados do estudo da enzima MMP-2 ativa no músculo gastrocnêmio (Figura 11) apontaram aumento significativo no GOI (33,1%) e GDI (41,1%) quando comparados ao GC. Já o GCI apresentou aumento de 26,2% em relação ao GC, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Na comparação entre os grupos imobilizados não foram observadas diferenças significativas.

Na quantificação da enzima MMP-9 ativa do músculo gastrocnêmio (Figura 11) apenas o GDI apresentou diferença estatisticamente significativa apontando uma elevação

de 54,5% em comparação com o GC. Os demais grupos (GCI e GOI) exibiram aumento na quantidade da enzima MMP-9 ativa em relação ao GC, no entanto essa diferença não foi significativa. Quando foram comparados apenas os grupos imobilizados, os resultados não apresentaram diferenças estatísticas. Os valores absolutos estão expressos na Tabela 5.

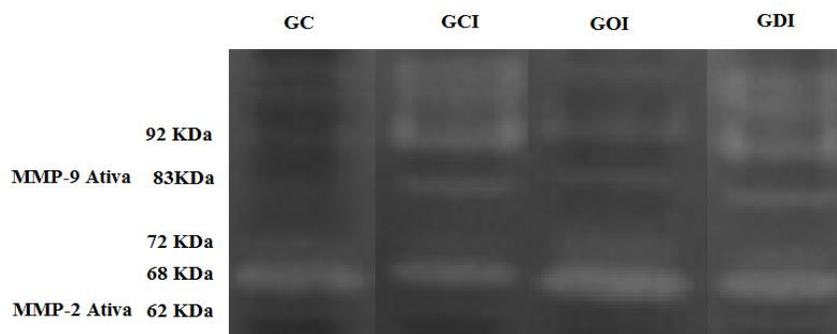


Figura 11: Gel de zimografia para análise da isoforma ativa das MMP-2 e MMP-9 no músculo gastrocnêmio. GC= Grupo Controle; GCI= Grupo Controle Imobilizado; GOI= Grupo Obeso Imobilizado; GDI= Grupo Desnutrido Imobilizado;

Tabela 5: Densitometria das bandas de zimografia das enzimas MMP-2 e MMP-9 ativa no músculo gastrocnêmio. Unidades expressas em valor de pixel. GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado;

Grupos	MMP-2 Ativa	MMP-9 Ativa
GC	1217±86,1	1788±127,6
GCI	1536±75,6	2101±133,7
GOI	1620±109,4*	2137±216,6
GDI	1717±128,9*	2892±306,8*

NOTA: \*valores estatisticamente significativos em relação ao GC ( $p < 0,05$ ). Valores expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão, Anova One Way com post hoc de Tukey de comparações múltiplas com  $p < 0,05$ .

No estudo da enzima MMP-2 ativa do músculo tibial anterior (Figura 12) os resultados apontaram um aumento na quantidade da enzima em todos os grupos imobilizados quando comparados ao GC. Os aumentos foram de GCI (211,7%), GOI

(215,7) e GDI (375,1%), em relação ao GC. Todos os resultados se mostraram estatisticamente significativos. Já na análise entre os grupos imobilizados não houve diferença estatística nas comparações.

A quantidade da enzima MMP-9 ativa no músculo tibial anterior (Figura 12) se apresentou maior em todos os grupos imobilizados quando comparados ao GC, no entanto, apenas o GCI apresentou aumento estatisticamente significativo (210%). Na comparação entre os animais imobilizados conseguimos averiguar uma maior quantidade da enzima no GCI quando comparado aos GOI e GDI, porém, sem significância estatística. Os dados com os valores absolutos estão expressos na Tabela 6.

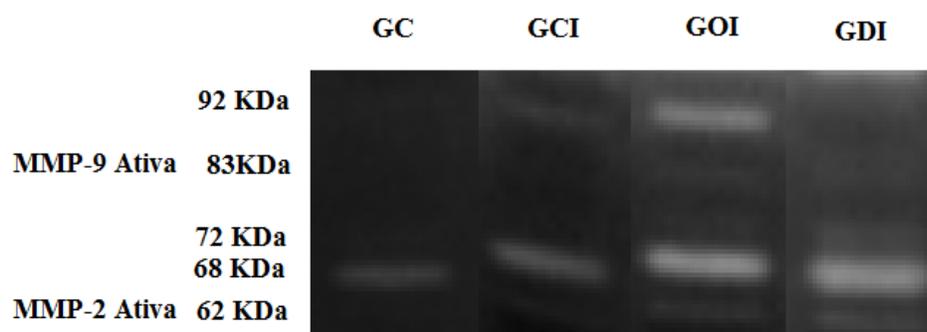


Figura 12: Gel de zimografia para análise da isoforma ativa das MMP-2 e MMP-9 no músculo tibial anterior. GC= Grupo Controle; GCI= Grupo Controle Imobilizado; GOI= Grupo Obeso Imobilizado; GDI= Grupo Desnutrido Imobilizado;

Tabela 06: Densitometria das bandas de zimografia das enzimas MMP-2 e MMP-9 ativa no tibial anterior. Unidades expressas em valor de pixel. GC=Controle; GCI=Controle Imobilizado; GOI=Obeso Imobilizado; GDI=Desnutrido Imobilizado;

Grupos	MMP-2 Ativa	MMP-9 Ativa
GC	374±101,8	902±40,3
GCI	1166±76,1*	2584±573,1*
GOI	1181±54,6*	2031±148,9
GDI	1777±126,5*	1470±93,8

NOTA: \*valores estatisticamente significativos em relação ao GC. Valores expressos na forma de média ± erro padrão, Anova One Way com post hoc de Tukey de comparações múltiplas com  $p < 0,05$ .



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Peso corpóreo e consumo alimentar

Considerando a dificuldade de estudar a obesidade e a desnutrição proteica em humanos dentro de um ambiente experimental, devido a uma condição ética lógica que envolve tal procedimento, alguns modelos animais vêm sendo amplamente utilizados com o intuito de evidenciar as características específicas desses grupos.

No caso da obesidade experimental o procedimento mais empregado na literatura consiste em submeter animais a uma dieta rica em gordura High-Fat Diet (HFD). Este modelo representa com fidedignidade o comportamento alimentar do homem moderno, que segundo a organização mundial da saúde (OMS, 2002) tem aumentado consideravelmente o consumo de alimentos com alto teor de gordura, sobretudo gorduras saturadas, conhecidas por serem potencialmente prejudiciais ao organismo. Seguindo a mesma linha experimental, a desnutrição proteica vem sendo desenvolvida em animais por meio de procedimentos que evidenciam uma ingestão de alimentos pobres em proteínas e nutrientes em períodos característicos da vida, sobretudo na infância, onde, os casos de desnutrição são mais frequentes, graves e próximos da realidade humana (ALVES, 2008).

Nossos resultados mostraram que, animais do GOI, que consomem dieta rica em gordura, apresentam redução da quantidade de ração ingerida (g) quando comparados ao GC. Contudo, quando consideramos que a HFD utilizada tem um conteúdo calórico maior que a dieta controle, esse parâmetro sofre uma inversão.

Nossos dados são reforçados por resultados encontrados na literatura que mostram que animais submetidos a uma HFD consomem quantidade reduzida de dieta (g), porém, em termos calóricos, os mesmos consomem volume maior quando comparados aos animais do GC. Dessa forma, ocorre um maior ganho no peso corpóreo e conseqüente acúmulo exacerbado de tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal, característicos da obesidade mórbida. Portanto, nossos dados corroboram com os da literatura (AHREN et al., 1997;

HANSEN et al., 2004; VELKOSKA et al., 2005; SHIRAEV et al., 2009) sobre peso corpóreo e quantidade de tecido adiposo em animais que consomem HFD.

Os dados da nossa pesquisa que se referem ao grupo de animais desnutridos (GDI) mostraram que o consumo alimentar nesse grupo é maior em relação aos demais em ambos os períodos verificados, porém, a diferença estatística é evidenciada apenas no período pós-imobilização. Esse aumento na ingestão em relação aos demais grupos não deixou de caracterizar o GDI, pois, segundo autores esse fenômeno é um reflexo da própria desnutrição proteica, uma vez que esta condição induz hiperfagia no animal (BENTO-SANTOS, 2012).

Corroborando com nossos estudos alguns autores demonstraram em ratos que a restrição alimentar (30% da ingestão do controle) e a desnutrição proteica (8% de caseína) durante a gestação e lactação induzem hiperfagia e preferência por alimentos calóricos na prole ao longo do desenvolvimento até a idade adulta (VICKERS et al., 2000; COUPE et al., 2009). Esses efeitos parecem estar associados a um atraso na sensação de saciedade, um aumento no tamanho da refeição e uma redução no período de latência para comer (VICKERS et al., 2000; COUPE et al., 2009). No entanto, essa hiperfagia não compensa o metabolismo enérgico-proteico do animal, pois, a ingestão de proteínas continua sendo menor em relação ao grupo controle e, conseqüentemente, o peso e as reservas adiposas também se apresentam diminuídas nesses animais, fatos que foram evidenciados em nosso estudo.

Outro dado importante relacionado à ingestão alimentar foi o fato de que a imobilização não foi capaz de causar alterações sobre esse parâmetro, em ambos os grupos experimentais, quando comparados em período pré e pós-imobilizados.

Apesar de não observarmos diferença no consumo alimentar dos animais em condições pré e pós-imobilização, os animais imobilizados tiveram perda de peso acentuada em relação ao período pré-imobilização. Segundo Dittmier & Teasell (1993), esse fenômeno pode ser explicado, principalmente, devido a uma perda da massa muscular global, onde devido à imobilização, a velocidade da síntese proteica não acompanha a rápida proteólise muscular, fato que já podemos evidenciar após algumas horas de imobilização. Dittmier & Teasell (1993) ainda ressalta que o animal/indivíduo não sofre

apenas perda do tecido muscular global, e sim em diversos segmentos e sistemas do organismo como no tecido ósseo e no cardíaco.

## **6.2. Análise da atividade locomotora**

O teste de atividade locomotora em campo aberto, descrito originalmente por Hall em 1941, explora a reação natural de roedores a espaços abertos e é usado para avaliar o comportamento locomotor fornecendo simultaneamente dados/avaliações sobre a locomoção e exploração de ambientes (NAHAS, 1999; RIBEIRO et al., 2012).

Em nossos estudos, quando analisamos a atividade locomotora diurna no período pré-imobilização (91 dias), pudemos observar que não houve diferença estatística entre os grupos estudados, conforme dados apresentados na Figura 3. Da mesma forma quando analisamos aos 105 dias, constatamos que o procedimento de imobilização não reduziu significativamente a atividade locomotora nos grupos imobilizados em comparação ao GC durante o período diurno. Tal fato pode ser explicado, pois, sabe-se que a maioria dos roedores é apontada como espécies de hábitos noturnos e concentram suas atividades na fase escura do dia (MEZADRI et al., 2011). Sendo assim, o período diurno ficou destinado ao repouso dos animais, fato que justifica nossos achados e aponta que animais imobilizados e não imobilizados permaneceram, na maioria desse período, em estado de repouso.

Nossos resultados referentes à atividade locomotora noturna pré-imobilização (91 dias) demonstraram que os grupos GOI e GDI apresentam redução significativa na atividade locomotora quando comparados ao GC (Figura 4). Esses resultados sugeriram que os animais que ingeriram dietas hiperlipídica (GOI) e hipoproteica (GDI) apresentaram um padrão menor na deambulação quando comparados ao GC em condições pré-imobilização/livre.

Baseado em nossos resultados que revelaram peso corpóreo elevado no GOI em comparação ao GC aos 91 dias (Figura 1), sugerimos a hipótese de que esses animais apresentam menor atividade locomotora devido ao excesso de peso e ao acúmulo de tecido

adiposo no organismo (Tabela 1), episódios diretamente relacionados às condições de sedentarismo.

Estudos indicam que o excesso de peso compromete a saúde dos indivíduos, acarretando diversos prejuízos, tais como deficiências na função musculoesquelética e no sistema proprioceptivo (STEINDL, et al., 2006; WEARING et al., 2006; D'HONDT, et al., 2008; BARBACENA, 2011). Pinho e Petroski (1999) verificaram que indivíduos com sobrepeso ou obesidade apresentavam o sedentarismo como característico no seu comportamento motor. Na literatura é encontrada uma associação entre a obesidade e um menor tempo dedicado à atividade física, caracterizando os hábitos sedentários desses indivíduos/animais (DURANT et al., 1994).

Em analogia a nossos achados, as pesquisas de Baruki et al., (2006) e Vader et al., (2009) apontaram que indivíduos obesos possuem um comportamento sedentário quando comparado aos indivíduos eutróficos. Da mesma forma estudos demonstraram que crianças obesas são menos ativas comparadas àquelas que se encontram dentro do peso e IMC normais (MALINA et al., 2009). Estes achados literários fortalecem nossa hipótese sobre o comportamento de animais obesos em relação à diminuição da atividade locomotora.

Os resultados da atividade locomotora noturna do GDI no período pré-imobilização (91 dias) apontaram que estes animais apresentaram um padrão diminuído de atividade locomotora quando comparados ao GC. Tal fato pode ser fundamentado, pois, na literatura existem evidências de que há prejuízos na função muscular e conseqüente diminuição da força, na presença da desnutrição (NORMAN et al., 2011). Newman et al., (2003) demonstraram, de modo similar, que a desnutrição está associada à diminuição da massa magra, e que tal variável está intimamente relacionada à força, podendo dessa forma interferir no processo de deambulação dos indivíduos.

Corroborando com nossos achados Barros et al., (2006) observaram diminuição na atividade locomotora de ratos submetidos à desnutrição no período crítico do desenvolvimento, o que pode indicar um retardo no desenvolvimento do sistema neuro/músculo-esquelético. Já em contraste com nossos resultados 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. Este achado foi associado a um retardo na maturação de estruturas do SNC que modulam a expressão do movimento voluntário.

Dessa forma, os padrões de locomoção, que se desenvolvem de acordo com uma sequência cronológica, e dependem da postura e gravidade, assim como, da integridade do sistema neuro/músculo-esquelético, podem sofrer alterações devido à interferência de adversidades nutricionais (FOX, 1965; WALTON et al., 1992; GRAMSBERGEN, 1998; BARROS et al., 2006).

A técnica de imobilização com esparadrapo/gesso, adaptada para uso em camundongos e utilizada neste estudo, mostrou-se eficiente, de simples aplicação, pouco trabalhosa, fundamental para manter o membro na posição encurtada durante todo o período estudado (14 dias) e, conseqüentemente, desenvolveu características específicas para os grupos estudados em âmbito experimental.

Avaliando a atividade locomotora noturna nos animais imobilizados (105 dias) pudemos notar que todos os grupos apresentaram diminuição da atividade quando comparados ao GC (Figura 1). Sugere-nos, portanto, que o procedimento utilizado de imobilização articular gerou uma redução no padrão deambulatório dos animais nos grupos GCI, GOI e GDI. Já quando foram realizadas comparações apenas entre os grupos imobilizados não foram observadas diferenças estatísticas.

A imobilização articular possui efeito na função muscular, pois acarreta um aumento na vulnerabilidade às perturbações morfológicas, funcionais e biomecânicas no músculo (PAIXÃO et al., 2011). Essas perturbações causam prejuízo na qualidade de vida do indivíduo, o que concorda com nossos achados, onde verificamos que os animais imobilizados apresentaram um padrão deambulatório reduzido quando comparados ao GC, sugerindo, assim, uma menor liberdade de locomoção em ambiente experimental.

Apoiando nossos achados, Silva et al., (2009) verificaram uma diminuição na atividade locomotora de animais previamente imobilizados quando comparados com animais controle. Sendo assim, os autores demonstraram que a condição de imobilização articular conduz o indivíduo a uma situação de redução provisória de suas habilidades locomotoras, podendo influenciar negativamente a sua vida e seus hábitos diários.

### **6.3. Dados histológicos dos músculos**

Cerca de 40% do corpo dos mamíferos é composto por tecido muscular esquelético, sua massa e composição estão constantemente em processo de remodelagem para se adaptarem às funções impostas no dia-dia, podendo assim ocorrer alterações metabólicas e estruturais no tecido muscular, caso haja um desequilíbrio entre as condições impostas ao músculo em nosso cotidiano (PAIXÃO et al., 2011). Portanto, o emprego da imobilização articular acaba por gerar um comprometimento na homeostasia das fibras musculares.

Neste estudo, foram priorizados os músculos gastrocnêmio e tibial anterior por possuírem fácil acesso, estarem próximos anatomicamente e apresentarem características distintas. A imobilização experimental utilizada gerou perda da massa muscular (mg) do músculo gastrocnêmio em todos os grupos imobilizados quando comparados ao GC. No entanto, o peso do músculo tibial anterior (mg) apresentou redução significativa apenas no GDI quando comparado ao GC. Com isso, concluímos que o músculo tibial anterior foi menos afetado em relação ao gastrocnêmio. Isso se justifica pelo fato do músculo tibial anterior permanecer em uma posição alongada durante o período de imobilização e que, segundo Williams e Goldspink (1984), essa posição favorece uma atrofia mais lenta do tecido muscular. Corroborando com nossas pesquisas Durigan et al., (2006) salientaram que a imobilização por diferentes períodos e diversos métodos resulta em atrofia muscular, variando de 15% a 70%, dependendo dos animais utilizados e das fibras avaliadas em cada músculo.

Os resultados expressos nas Tabelas 2 e 3 mostraram uma redução na área de secção transversa e no diâmetro das fibras musculares dos músculos esqueléticos nos grupos imobilizados quando comparados ao controle. Tal fato indica que houve perda e consequente atrofia do tecido muscular, o que condiz com achados de diferentes pesquisadores em relação ao músculo esquelético submetido à imobilização (LIMA-SILVA et al. 2007; FALEMPIN & MOUNIER, 1998; ZHANG; CHEN; FAN, 2007; SANTOS-JUNIOR et al., 2010).

Reforçando nossos estudos, Slimani et al. (2012) demonstraram que os músculos gastrocnêmio e tibial anterior, quando imobilizados, apresentavam maior porcentagem de atrofia em relação a seus controles, com maior comprometimento do gastrocnêmio. Este episódio pode ser explicado ao menos por duas hipóteses: 1) diferença da posição anatômica entre os músculos e 2) diferença dos tipos de fibras.

Com relação à posição anatômica, os músculos cujas ações são antigravitacionais, como no caso o gastrocnêmio, que está localizado posteriormente em relação ao tibial anterior, apresenta maior grau de atrofia em situações de desuso como na imobilização articular (CAIOZZO et al., 1996). No que concerne à diferença da tipagem de fibras, Talmadge (2002) verificou que as fibras do tipo I possuem menor capacidade de adaptação quando comparadas às fibras do tipo II e, portanto, são atingidas mais intensamente pelo desuso. Este fato foi evidenciado em nossos resultados, pois, o gastrocnêmio é um músculo misto com predominância de fibras do tipo I, enquanto o tibial anterior é predominante em fibras tipo II.

Avaliando especificamente os grupos imobilizados podemos notar que o peso dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior diminuíram significativamente no GDI quando comparados ao GCI, enquanto o peso dos mesmos músculos no GOI não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao GCI. Todavia, quando analisamos a área de secção transversa e o diâmetro das fibras, ambos os grupos, GOI e GDI, tiveram uma redução significativa dessas variáveis em comparação ao GCI.

Considerando os resultados obtidos, concluímos que o tecido muscular dos animais GOI e GDI sofreu prejuízo acentuado quando submetido ao procedimento de imobilização. Baseados nesses resultados, levantamos a hipótese de que os animais que se alimentam com as dietas HSD (GOI) e hipoproteica (GDI) podem desenvolver mecanismos que potencializam de forma negativa a atrofia do tecido muscular, o que pode causar um maior comprometimento na homeostase dos músculos estudados quando comparados ao GCI.

Kimball et al. (1994) e Santos-Junior (2010) afirmaram que a perda de massa muscular é uma característica comum no estado diabético/obeso, na restrição alimentar ou ainda na inatividade física prolongada, como acontece em casos de imobilização articular. Pautados nessas informações, acreditamos que em ambas as condições impostas, a consequente interação entre os estados de imobilização/obesidade e imobilização/desnutrição se mostraram fatores determinantes para o desenvolvimento de uma potencialização na atrofia muscular dos grupos GOI e GDI estudados em nossa pesquisa.

Para o desenvolvimento da musculatura esquelética e a manutenção da massa muscular nos indivíduos, faz-se necessário um suprimento de insulina e uma quantidade

adequada de atividade contrátil (SANTOS-JUNIOR et al., 2010). As ações da insulina sobre o metabolismo proteico são especialmente importantes no tecido muscular. Assim, os efeitos anabólicos desse hormônio são reforçados por suas ações anticatabólicas. Contudo a insulina inibe a proteólise, suprime a liberação e inibe a oxidação dos aminoácidos essenciais (LUCIANO, 1998).

Considerando-se essas características, acreditamos que os animais dos grupos GOI e GDI sofreram danos mais acentuados no tecido muscular, pois além de estarem acometidos pela condição de imobilização, comumente, quando em condições de obesidade e desnutrição proteica, apresentam distúrbios nos mecanismos de suprimento e utilização do hormônio insulina, o que potencializa seu estado catabólico muscular.

As doenças como a obesidade e a desnutrição proteica parecem atuar como fatores etiológicos nas alterações do tecido muscular esquelético. Na obesidade a resistência à insulina é caracterizada pela redução do transporte e do metabolismo de glicose tanto nos adipócitos quanto no músculo esquelético. Esses fatores comprometem a supressão da produção de glicose pelo fígado e com isso, acarretam deficiência na sinalização da insulina nos três tecidos-alvos (TONUCCI e TOLEDO, 2011).

Particularmente no músculo esquelético a condição de resistência à insulina gera um mecanismo dificultado de glicogênese com conseqüente falta de substrato energético para o músculo realizar seu ciclo de encurtamento/estiramento. Dessa forma um músculo acometido por essas condições pode desencadear um processo de atrofia por resistência à insulina (CHINGUI, 2008).

Corroborando com nossos achados a respeito da desnutrição proteica, estudos experimentais demonstraram que filhotes de ratas expostas a tal procedimento apresentaram diminuição na área e no diâmetro das fibras musculares do gastrocnêmio e tibial anterior (NASCIMENTO et al, 1990; ALVES et al, 2008). Da mesma forma, outros estudos, demonstraram que filhotes de ratas expostas à desnutrição proteica durante a gestação e lactação, apresentaram alteração na quantidade e proporções de fibras musculares, além de resistência à insulina na idade adulta (OZANE et al., 2003; OZANE et al., 2005; TOSCANO et al., 2008).

No caso das associações entre a obesidade, desnutrição proteica e imobilização articular, os músculos analisados obtiveram um acréscimo na atrofia em relação a cada

condição isolada. Portanto, o procedimento de imobilização articular de um paciente obeso ou desnutrido deve ser criterioso, especialmente pelas consequências que a imobilização acarreta ao metabolismo que, por si só, em condições de obesidade e desnutrição, gera um comprometimento muscular importante.

#### **6.4. Dados histológicos do tecido ósseo (tíbia)**

Os tecidos do nosso organismo respondem à situação de estresse mecânico e, conforme exigidos, modificam suas propriedades. O mesmo pode ser aplicado à ausência total de movimento, que pode ser considerado um estresse e, conseqüentemente, levar à adaptações dessas estruturas, fato que pode ser evidenciado até mesmo no tecido ósseo (LECOQ et al., 2006; SANTOS-JUNIOR, 2010).

Trebacz (2001), Silva e Volpon (2004), analisaram os ossos de ratos submetidos à imobilização e verificaram que a hipoatividade causou redução significativa nos valores de suas propriedades mecânicas, o que ocasionou o seu enfraquecimento.

Nosso estudo optou pela utilização da tíbia por se tratar de um osso anatomicamente relacionado com os músculos priorizados neste estudo. O Protocolo de imobilização utilizado gerou redução do número de osteócitos e diminuição no diâmetro do canal medular ( $\mu$ ) em todos os grupos imobilizados quando comparados ao GC. No entanto a espessura da camada cortical apresentou redução significativa apenas nos grupos GDI e GCI quando comparado ao GC. Dessa forma, baseados em nossos resultados, concluímos que o procedimento de imobilização articular causa prejuízo no tecido ósseo avaliado.

O estímulo mecânico pode justificar tais resultados, pois quando diminuído, quer seja por hábitos sedentários ou pelo desuso causado por condições sistêmicas ou regionais, como a imobilização, acarreta um processo de adaptação com aumento da reabsorção óssea e, conseqüente enfraquecimento ósseo. Resultado que parece estar relacionado com a queda no metabolismo ósseo, o que provoca uma diminuição na quantidade de células para a manutenção desse tecido (SILVA, 2004; SANTOS-JUNIOR, 2010).

Segundo estudos de Minaire (1989) e Yeh et al.(1993), a imobilização permite a reabsorção óssea e a depressão da sua formação. Acarreta em diminuição da massa óssea com relação ao seu volume e alterações simultâneas no material e propriedades geométricas do osso. Estima-se que cerca de 30% do total da perda óssea induzida pela imobilização experimental em ratos seja causada pelo aumento da reabsorção óssea e, aproximadamente 70% pela diminuição da formação óssea (WEINREB, et al., 1989).

Reforçando nossos achados, Kiratli (1996) evidenciou que a imobilização articular resulta em um desbalanceamento no metabolismo ósseo, seguido por uma perda rápida de tecido e comprometimento da função mecânica. De acordo com a teoria de adaptação estrutural proposta por Frost (1990), a diminuição do uso mecânico reduz o ganho de massa óssea, deprime o crescimento longitudinal do osso e estimula a perda óssea dependente da reabsorção.

Em contrapartida, Portinho, Boin e Bertolini (2008), verificaram que duas semanas de imobilização não provocaram alterações significativas no diâmetro do canal medular e na espessura óssea do fêmur em ratos *Wistar*, todavia, ocorreu uma diminuição significativa no número de osteócitos nesses animais. Esses achados são justificados baseados em estudo prévio, onde o autor verificou que o período de imobilização, idade, espécie do animal e o osso analisado influenciam diretamente nos achados referentes ao tecido ósseo (TREBACZ, 2001).

Analisando, especificamente, os grupos imobilizados, pudemos notar que, o número de osteócitos não apresentou diferença estatística nas comparações entre os grupos. No entanto, o resultado da avaliação da espessura da camada cortical apresentou diferença estatística apontando uma redução de 15,8% no GDI quando comparado ao GCI. Na avaliação do diâmetro do canal medular os grupos GOI e GDI apresentaram valores significativamente maiores quando comparados ao GCI. Pautados nesses resultados observamos que os animais do GOI e GDI apresentaram, de forma geral, um maior prejuízo no tecido ósseo quando comparados ao GCI.

A respeito dos resultados encontrados para o GOI, pudemos observar que apenas o diâmetro do canal medular apresentou valores elevados em relação ao GCI. Em contrapartida, os valores relacionados à contagem de osteócitos e espessura da camada cortical não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao GCI. Portanto, podemos

sugerir que os animais obesos (GOI) apresentaram um pequeno desfavorecimento no metabolismo ósseo quando comparados com animais do GCI.

Estudos realizados em adultos e crianças têm mostrado que a massa óssea está diretamente relacionada com o peso corporal do indivíduo, embora existam controvérsias quanto ao fato de saber se, a massa gorda ou a magra é o determinante mais importante da densidade óssea (REID, 2002; WANG et al., 2005). A associação positiva (direta) entre o peso corporal e a massa óssea pode ser atribuída ao aumento da carga mecânica sobre o esqueleto, particularmente nos elementos corticais (WANG et al., 2005).

No entanto, o tecido ósseo parece extremamente sensível à redução no peso corporal. Estudos recentes tem mostrado que uma redução de 10% no peso corpóreo pode afetar negativamente o tecido ósseo, o que pode reduzir a massa em 2% (COMPSTON et al., 1992; RICCI et al., 1998). O impacto pode ser ainda maior em indivíduos expostos a uma rápida e intensa perda de peso (FOGELHOLM et al. 2006) quando comparados àqueles que apresentam redução moderada em longos períodos (SHAPSES et al., 2001).

Com base nesses achados sugerimos a hipótese de que o GOI apresentou aumento no diâmetro do canal medular devido a uma mudança estrutural óssea ocorrida como consequência da perda rápida do peso corpóreo, acontecida no momento em que os animais passaram pelo procedimento de imobilização articular. No entanto, para uma melhor compreensão desses mecanismos serão necessários estudos elucidativos por meio de técnicas celulares e moleculares.

Considerando-se que os grupos GCI e GDI estão em condições semelhantes, no que se refere ao procedimento de imobilização articular, destacamos que os resultados apresentados para o GDI indicam que a ingestão da dieta com baixo teor de proteína acentuou a perda óssea e o aumento na fragilidade do osso, por meio de mecanismos que, provavelmente, envolvem alterações na regulação dos níveis de IGF-1.

Estudos clínicos e experimentais sugerem que as proteínas da dieta influenciam a produção e a ação de fatores do crescimento, particularmente o hormônio de crescimento (GH), que pode influenciar no metabolismo ósseo. Além disso, outro fator influenciado pelo consumo de proteínas, que também desempenha um papel chave no metabolismo ósseo, é o metabolismo do IGF-1. Portanto, altos níveis de IGF-1 contribuem para a

formação do osso, enquanto baixos níveis promovem reabsorção óssea (ROSEN, 1994; CANALIS, 1996; SCHURCH et al., 1998).

Segundo Isley et al., (1983) e Thissen et al., (1994), uma dieta protéica influencia na produção e na ação do IGF-1 e, assim, no metabolismo ósseo. A restrição proteica reduz os níveis plasmáticos de IGF-1 por induzir uma resistência à ação do hormônio GH no fígado (VANDEHAAR et al., 1991) e por aumentar a taxa de depuração metabólica do IGF-1 (THISSEN et al., 1992). Por outro lado, o aumento da ingestão proteica impede a diminuição dos níveis de IGF-1 observado em estados de desnutrição, e a realimentação de pacientes subnutridos aumenta e restaura os níveis de IGF-1 (JANSEN et al., 1982; MUSEY et al., 1993).

Ammann et al., (2000) observaram os resultados das análises histomorfométricas e dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea em animais submetidos a quatro meses de privação proteica, e estes indicaram que a ingestão de dietas com baixo teor de proteína diminuiu a massa e a força óssea, pois ocorre adelgaçamento da camada cortical do osso avaliado, fato relacionado a um desacoplamento entre formação e reabsorção óssea. Os dados acima reforçam nossos achados e nos faz ainda ressaltar outro estudo de Amman et al. 1996 onde os mesmos utilizaram como modelo experimental ratas fêmeas adultas e privação proteica seletiva, com uso de dieta isocalórica, contendo baixo teor de proteínas e quantidades normais de minerais e, notaram que houve diminuição da densidade mineral óssea no tecido esquelético dos animais. Neste modelo as diminuições da massa e força óssea foram relacionadas a uma diminuição precoce na quantidade plasmática de IGF-I.

### **6.5. Dosagem da enzima Creatina Quinase (CK)**

A creatina quinase consiste de uma proteína dimérica globular, composta por duas subunidades (B e M) e possui ao menos cinco isoformas, três no citoplasma e duas nas mitocôndrias. As isoformas citoplasmáticas são: CK-BB, predominantemente no cérebro, CK-MB predominante no miocárdio e, CK-MM predominante no músculo esquelético. Já as duas isoenzimas mitocôndriais são a sarcomérica e não sarcomérica. Essas duas

isoenzimas mitocondriais são conhecidas como macro-CK, devido aos seus elevados pesos moleculares. As isoenzimas (CK-BB, CK-MB e CK-MM) compõem a chamada CK-total e cada uma fornece informações específicas do tecido lesionado conforme suas predominâncias (HORTOBAGYI e DENAHAN, 1989; BRANCACCIO et al., 2007).

No tecido muscular esquelético, a CK-MM tem como função auxiliar o metabolismo na ressíntese de adenosina trifosfato (ATP) e está envolvida na primeira e mais simples via energética para fosforilação do ATP. Além do ATP, encontra-se no organismo outra molécula que contém fosfato de alta energia, a creatina fosfato (CP). A CK é responsável pela hidrólise da CP, separando o fosfato inorgânico (Pi) da creatina e assim, liberando energia e fosfato. Contudo, a energia liberada não é utilizada diretamente na contração muscular, mas sim, para ligar uma molécula Pi a uma molécula de ADP, dando origem ao ATP (TRUMP et al., 1996; FOSCHINI et al., 2007).

A concentração plasmática de algumas proteínas miofibrilares é, normalmente, utilizada para estimar a ocorrência e magnitude da lesão no músculo esquelético (SORICHTER et al., 1997). A creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), troponina-I e mioglobina, frequentemente são encontradas como marcadores de dano muscular, isso porque o aumento dos seus níveis plasmáticos constitui uma indicação de que as células musculares atingidas (atrofiadas) perderam a capacidade de regular a permeabilidade dessas proteínas (KASPER et al., 2002). Por esse fato, o aumento da concentração sérica dessas enzimas é indicativo de dano no sarcolema e em outras estruturas teciduais (KAUHANEN et al., 1993).

Clinicamente, a CK é o marcador mais utilizado para diagnóstico de lesão muscular. No caso de atrofia como, por exemplo, em um protocolo de imobilização por suspensão dos membros traseiros, a CK é super expressa, o que a torna um bom marcador da adaptação do músculo esquelético ao desuso, e por isso, frequentemente, utilizada (CROS et al., 1999).

Nossos resultados mostraram em todos os grupos imobilizados, aumento dos níveis séricos da enzima CK quando comparados ao GC. Isso nos levou sugerir que o procedimento de imobilização utilizado gerou distúrbios nos mecanismos de permeabilidade celular das fibras musculares. Por outro lado, na análise dos grupos imobilizados não foram evidenciados resultados com diferenças estatísticas entre os grupos

estudados. Esse fato nos permitiu sugerir que os quadros de obesidade e desnutrição proteica não influenciaram sobre as quantidades séricas de CK.

A razão pela qual a enzima CK se apresenta aumentada nos grupos imobilizados pode ser explicada pelo fato de que as fibras musculares, em situação de desuso por imobilização, desenvolvem determinadas adaptações funcionais, bioquímicas e morfológicas e, portanto, tornam-se agressivas ao tecido, uma vez que alteram a homeostasia e, conseqüentemente, a permeabilidade celular em locais específicos do sarcolema e do sarcoplasma. (HILL e LAVIA, 1980; APPEL e SOARES, 1990).

A perda da homeostasia no metabolismo do íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) na fibra muscular esquelética é considerada como um dos mecanismos responsáveis pela perda de viabilidade parcial ou total da célula (ARMSTRONG, 1990; ARMSTRONG et al., 1991, 1993; BYRD, 1992).

Diversos mecanismos estão envolvidos na alteração homeostática do íon  $\text{Ca}^{2+}$  e como exemplo, destacamos: a perda da integridade do sarcolema e/ou alteração na sua permeabilidade (ARMSTRONG, 1990; ARMSTRONG et al., 1991), a disfunção do retículo sarcoplasmático (BYRD, 1992) e a produção exagerada de compostos reativos de oxigênio, motivando o aparecimento de uma situação de stress oxidativo tecidual (ARMSTRONG et al., 1991; BYRD, 1992; KONDO et al., 1992, 1993; JI, 1995). A ocorrência de qualquer um destes mecanismos perturbadores promove o aumento das concentrações de cálcio no meio intracelular, ativando, hipoteticamente, os processos de degeneração intrínseca da célula (CASTRO, 2000).

Corroborando com nossos estudos Kauhanen et al., (1993) e Leivo et al., (1998) demonstraram que a atividade da CK no plasma aumentou drasticamente nas primeiras horas de imobilização, atingiu seu valor máximo por volta das 24 horas e manteve-se elevada por mais 24-48 horas. Da mesma forma, Cros et al., (1999), analisaram ratos imobilizados submetidos ao protocolo de suspensão do membro pélvico e após quatro dias notaram um aumento na expressão do RNAm da enzima CK no músculo sóleo desses animais.

Quando Kauhanen et al., (1993) e Leivo et al. (1998) imobilizaram joelhos de coelhos, a fim de verificar a atrofia do músculo vasto lateral, notaram que a atividade da CK, no grupo controle, apresentava resultados entre 400-1800 g/dl, enquanto no grupo

imobilizado, após 12 horas, os animais apresentavam valores bastante elevados, atingindo os valores máximos (13000 g/dl) perto das 24 horas.

Em conformidade com as alterações acima descritas, podemos inferir que, por esta enzima ser abundante no sarcoplasma das fibras do músculo esquelético, os resultados sugeriram que as membranas das células perderam a sua permeabilidade seletiva em consequência do processo de atrofia.

### **6.6. Dosagem do glicogênio intramuscular**

A musculatura esquelética é o tecido mais importante envolvido na homeostasia glicêmica devido à sua capacidade de captar grandes quantidades de glicose após infusão ou ingestão. Em condições basais, as fibras musculares esqueléticas apresentam pequenas concentrações citosólicas de glicose, porém, frente à hiperinsulinemia, hiperglicemia ou atividade física, ocorre uma maior captação da hexose, que pode ser oxidada ou direcionada para formação de glicogênio (EXTON, 1987).

Admitindo-se que o glicogênio intramuscular é a principal fonte energética do músculo (CHINGUI, 2008) e que os experimentos desta pesquisa envolveram o tecido muscular em situações distintas, optamos por quantificar as reservas de glicogênio nos músculos gastrocnêmio e tibial anterior ('pool' das amostras) de animais submetidos às condições de imobilização, obesidade e desnutrição proteica.

Os resultados deste trabalho mostraram que o mecanismo de glicogênese muscular não foi afetado pelo procedimento de imobilização articular. Sendo assim os animais que passaram por esse procedimento não apresentaram diferenças significativas nas reservas de glicogênio quando comparados ao GC.

Nossos achados diferem dos demais da literatura, onde pesquisas utilizando ratos *Wistar* apontaram que o processo de imobilização gera um considerável comprometimento metabólico na musculatura esquelética, induzindo resistência à insulina e, conseqüentemente redução das reservas de glicogênio intramuscular devido a uma glicogênese dificultada. (LUCIANO, 1998; PTERMANN et al., 2005; CHINGUI et al.,

2008). Sugerimos que essa divergência nos resultados possa ser explicada pelo fato de que nosso trabalho optou pela utilização de uma linhagem animal que difere dos demais estudos verificados e também pela utilização de um ‘pool’ das amostras do tecido muscular. Entretanto, mais estudos devem ser realizados com o propósito de elucidar tais achados.

Estudo realizado por Hirose et al., (2000) verificaram que pacientes inativos fisicamente ou imobilizados apresentaram resistência à insulina e consequente redução das reservas de glicogênio muscular, porém não ficou elucidado como o desuso muscular crônico ou a imobilização alterou a sinalização de insulina.

O músculo esquelético utiliza preferencialmente a glicose como substrato energético e, a captação acontece de maneira multifatorial, dependendo, da presença da insulina, da atividade metabólica tecidual ou ainda, da atividade contrátil das fibras (BELL et al., 1990; GOODYEAR et al., 1991). O transporte de glicose pelas membranas das fibras musculares é feito por transportadores chamados GLUT (KLIP; PAQUET, 1990). O GLUT-1 é responsável pela captação basal de glicose e o GLUT-4, mais importante, participa efetivamente do controle glicêmico, detendo grandes quantidades de glicose, e pode ser translocado de reservatórios vesiculares citosólicos em direção à membrana (BURANT et al., 1991).

Em condições fisiológicas como no desuso muscular, o transporte de glicose por meio da membrana celular pode ser dificultado por uma diminuição dos transportadores GLUT-4 em resposta a resistência à insulina (HENRIKSEN et al., 1991), o que gera má utilização de glicose pelo músculo esquelético (KUBO; FOLEY 1986; CLINE et al., 1999). O estilo de vida sedentário é um fator que contribui para o desenvolvimento ou aumento da resistência a insulina por sua não sensibilização dos receptores do tipo GLUT (BASSUK; MANSON, 2005).

No que diz respeito aos resultados dos grupos imobilizados pudemos observar que o conteúdo de glicogênio intramuscular do GDI foi significativamente reduzido em relação aos demais grupos. Essas alterações parecem estar relacionadas ao aparecimento precoce da resistência à insulina na idade adulta desses animais.

Apoiando nossa hipótese, protocolos que utilizaram ratos adultos submetidos à desnutrição proteica, demonstraram precoce resistência à insulina associados à redução na expressão dos Transportadores de Glicose (GLUT-4), proteínas p85 e p110 (subunidades

da fosfatidilinositol 3-kinase) e de Proteína Kinase C zeta (PKC). Essas proteínas estão envolvidas positivamente com a propagação do sinal intracelular da insulina, com a translocação do GLUT-4 e com o transporte de glicose por meio da membrana sarcoplasmática (OZANE et al., 2003; OZANE et al., 2005).

### **6.7. Zimografia das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9**

A proteólise da matriz extracelular (MEC) nos tecidos é característica do remodelamento patológico e/ou de processos fisiológicos tais como: a morfogênese, o crescimento e a remodelação (ALLBROOK, 1981). No músculo esquelético o remodelamento depende, dentre outros fatores, da ação coordenada da degradação e síntese dos componentes da matriz extracelular. Portanto, modificações nos músculos esqueléticos, como o aumento ou a diminuição de atividade contrátil, lesão muscular que cause inflamação ou atrofia, ocasionarão o remodelamento da MEC (PAVESI, 2008).

Os componentes da MEC são constantemente renovados nas células por um importante grupo de enzimas proteolíticas, as metaloproteinases de matriz (MMPs) (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). As MMPs pertencem a uma família de enzimas cálcio e zinco dependente, divididas em cinco categorias principais e classificadas de acordo com as suas características bioquímicas e especificidade pelo substrato da MEC (NAGASE et al., 1999; GIANNELLI E ANTONACI, 2002). Dessa forma as MMPs são classificadas em collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas e metaloproteinases de membrana (MATOS et al., 2012).

A maioria das MMPs são secretadas pelas células em sua forma latente (pró-enzima) e, assim, precisam ser clivadas por proteases, outras MMPs ou passarem por auto-processamento para adquirirem uma conformação ativa (STERNLICHT e WERB, 2001; PARKS et al., 2004). As células, também, secretam proteínas inibitórias da atividade das MMPs. Esses inibidores são conhecidos como inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs) (WOESSNER et al., 1991). Assim, a atividade dessas enzimas é regulada por

meio de um complexo mecanismo de síntese, ativação e inibição. (PARKS et al., 2004; PAGE-MCCAWE et al., 2007).

As MMPs encontradas no tecido muscular são produzidas principalmente por células endoteliais (KUME, 2002), fibroblastos (KJAER, 2004) e mioblastos (HAEUSLER, 2005). Todavia, duas delas recebem destaque, as metaloproteinases dois (MMP-2) e nove (MMP-9), conhecidas respectivamente como gelatinase A e B (VISSE e NAGASE, 2003; CARMELI et al., 2004; CARMELI, et al., 2005).

A MMP-2 possui a capacidade de degradar vários componentes do tecido conjuntivo incluindo a elastina, fibronectina, colágenos do tipo I, II, III, IV e V e outros componentes da matriz extracelular. É expressa e secretada sob condições fisiológicas, tornando-se mais expressa diante dos fatores estimulantes (citocinas) em diversas condições como: miopatias, inflamação e remodelação muscular (STRONGIN et al., 1995; FERRUCCI, D. L., 2010). Além de participar da manutenção da integridade da matriz no tecido muscular, a MMP-2 parece ser parte integrante do processo de ativação, proliferação e diferenciação miofibrilar no tecido em processo de regeneração e remodelamento (OHTAKE et al., 2006; FERRUCCI, D. L., 2010).

A MMP-9 é produzida principalmente por células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos (MONTGOMERY et al., 1993; STAHLER-BACKDAHI et al., 1994). É liberada por meio da ativação de neutrófilos por mediadores inflamatórios (HASTY, 1990; NATHAN, 2006). Em condições fisiológicas não é encontrada em grande quantidade no tecido muscular, entretanto, em situações de danos as estruturas musculares ou em condições que envolvam mecanismos de isquemia-reperfusão, ou seja, que induzem degradação da lâmina basal, a MMP-9 se manifesta com mais expressividade. (MATRISIAN, 1992; ROACH, et al., 2002; FERRUCCI, D. L., 2010). Tem como função fisiológica eliminar células danificadas ou em processo de necrose, preparando assim o músculo esquelético para fase de reparo e regeneração (KHERIF, 1999; ZIMOWSKA, 2008).

As metaloproteinases MMP2 e MMP-9 exercem importante papel na manutenção da estrutura e atividade da lâmina basal. Tem sido relatado que as MMP-2 e MMP-9, em condições normais do músculo esquelético, têm expressão relativamente baixa (CARMELI et al., 2005), no entanto, em condições patológicas que promovem a degradação e

remodelação da MEC, um aumento na expressão destas enzimas é observado (KHERIF et al., 1999; REZNICK et al., 2003; BAR-SHAI et al., 2005; GIANNELLI et al., 2005).

Optamos pela quantificação da isoforma ativa das MMP-2 e MMP-9, em virtude destas serem formas diretamente atuantes nos mecanismos de remodelação da MEC, no tecido muscular. Para tanto, os músculos gastrocnêmio e tibial anterior foram avaliados individualmente por meio da técnica de zimografia e, posteriormente, quantificados pela densitometria de bandas, conforme descrito na metodologia.

Nossos resultados referentes à análise dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior, revelaram em todos os grupos imobilizados quando comparados ao GC (Tabelas 5 e 6), aumento na quantidade das isoformas ativas da MMP-2 e da MMP-9. De acordo com os achados, concluímos que a imobilização promoveu remodelamento da MEC no tecido muscular dos animais imobilizados. Segundo Carmeli e Haimovitch (2006) tal fato pode ser justificado, pois, alterações na exigência do músculo esquelético (sobrecarga ou redução da atividade contrátil) promovem o remodelamento da MEC e consequentemente ativam as MMPs específicas que irão garantir este processo.

Corroborando com nossos achados, Reznick et al., (2003) avaliaram as MMPs nos músculos sóleo e gastrocnêmio após imobilização e, verificaram por meio de zimografia, que a atividade das MMP-2 e MMP-9 sofreu aumento de expressão durante as quatro semanas de imobilização. Igualmente, Carmeli e Haimovitch (2006) revelaram que duas semanas de imobilização aumentaram (mas não estatisticamente significante) a expressão da MMP-2 no músculo plantar de ratos *Wistar*.

Contrário aos nossos achados, Gianelli et al., (2005) não detectaram a presença da isoforma ativa de MMP-9 no tecido muscular de animais imobilizados por 14 dias. Os autores destacaram que esta discrepância pode estar relacionada ao peso, idade e espécie dos animais utilizados nos diferentes estudos. Porém, concordando com nossos resultados, ainda Gianelli et al., (2005), observaram um aumento significativo da isoenzima ativa da MMP-2 em animais imobilizados quando comparados com animais controle.

O aumento inicial na atividade da MMP-2 e da MMP-9 observado em nosso estudo pode ser explicado pelo fato de que ambas as enzimas desempenharam um papel fundamental na proliferação e diferenciação dos mioblastos. Imediatamente após uma lesão, as células satélite são ativadas e tornam-se precursoras das células musculares,

chamadas mioblastos, que expressam um elevado nível de MMPs. Este aumento no nível das MMPs resulta na migração celular para áreas lesionadas, com a posterior diferenciação e fusão de mioblastos em miofibras (MARQUETI et al, 2008; PAVESI, 2008).

Na maioria dos estudos, a MMP-2 se relaciona com a regeneração de novas miofibras, possivelmente, devido à degradação do colágeno tipo IV na membrana basal. Por outro lado, a MMP-9 se relaciona, à ativação inflamatória inicial e a ativação de células satélites (KHERIF et al., 1999; OHTAKE et al., 2006; FUKUSHIMA et al., 2007). Contudo, Fukushima et al., (2007) sugeriram que ambas as MMPs (2 e 9) se relacionam com a degeneração e regeneração das fibras do músculo esquelético.

Dessa forma é provável que as respostas adaptativas ao desuso devam afetar o metabolismo muscular global e fazer com que ocorram algumas alterações na composição da MEC (CARMELI e HAIMOVITCH, 2006). Portanto, nossos dados sugerem que o aumento da atividade proteolítica da MEC parece desempenhar um papel importante na indução de atrofia dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior, provavelmente em decorrência da diminuição no volume das proteínas da matriz extracelular. (TAKATA e VIRTANEN, 2000).

Com isso, sugerimos que um desequilíbrio proteolítico na MEC pode desempenhar um papel importante na atrofia muscular induzida pelo desuso, mas destacamos que são necessários estudos posteriores a fim de expandirmos o conhecimento sobre este evento comum em nosso cotidiano.

## 7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo e, a partir da comparação desses dados com os demais descritos na literatura, podemos apresentar as seguintes conclusões:

- ✓ O protocolo de imobilização articular não reduziu a ingestão alimentar dos animais, no entanto, este procedimento gerou perda de peso corpóreo nos grupos experimentais (GCI, GOI e GDI) quando comparados em períodos pré e pós-imobilização. Da mesma forma, os animais imobilizados apresentaram peso corpóreo reduzido quando comparados ao grupo GC. Portanto, concluímos que o procedimento de imobilização articular apresenta capacidade de desenvolver atrofia sistêmica no organismo, independentemente do consumo alimentar dos animais.
- ✓ Ao se verificar a atividade locomotora diurna, foi possível afirmar que os resultados não apresentaram diferenças estatísticas devido ao período de avaliação estar relacionado ao repouso dos animais. Já na avaliação da atividade locomotora noturna podemos observar que os animais imobilizados demonstraram padrão deambulatório reduzido quando comparados ao grupo GC. Sendo assim, concluímos que a condição de imobilização articular conduz o indivíduo a uma situação de redução provisória de suas habilidades locomotoras, podendo influenciar negativamente na sua vida e em seus hábitos diários.
- ✓ Com relação aos resultados histomorfométricos da tíbia e dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior, concluímos que o procedimento de imobilização articular provocou atrofia musculoesquelética em animais de experimentação. No caso das associações entre a obesidade, desnutrição proteica e imobilização, os músculos analisados demonstraram acréscimo na atrofia em relação a cada condição isolada, evidenciando que os animais nessas condições apresentam um prejuízo muscular elevado.
- ✓ Baseados nos resultados da dosagem sérica da enzima CK, concluímos que o procedimento de imobilização articular provocou distúrbios nos mecanismos de permeabilidade celular das fibras musculares, evidenciando o aumento nos níveis plasmático dessa enzima. Por outro lado, podemos concluir que os quadros de obesidade e desnutrição proteica não influenciaram significativamente sobre a quantidade sérica de CK.

- ✓ Os resultados da dosagem de glicogênio intramuscular demonstraram que o mecanismo de glicogênese não foi afetado significativamente nos animais submetidos ao protocolo de imobilização, quando comparados ao grupo GC. Nossos dados diferem dos demais da literatura e nos fez sugerir que a linhagem animal estudada pode estar relacionada com a divergência verificada em nosso estudo.
- ✓ De acordo com os resultados da análise zimográfica das metaloproteinases 2 e 9 concluimos que o procedimento de imobilização promoveu o remodelamento da MEC e ativou as MMPs específicas.

Em suma, este estudo ampliou o conhecimento dos eventos envolvidos na atrofia músculo-esquelética, induzida por imobilização, e associada à obesidade e desnutrição. No entanto, estudos mais aprofundados nestas questões deverão ser conduzidos, de maneira que proporcione maiores informações científicas sobre a atrofia em períodos de imobilização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.R. Role of insulin-like growth factor-I in the regulation of skeletal muscle adaptation to increased loading. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v.26, p.31-60, 1998.
- AHREN, B.; SIMONSSON, E.; SCHEURINCK, A. J.; MULDER, H.; MYRSÉN, U.; SUNDLER, F. Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice. **Metabolism.**, v.46, n.1, p.97-106, 1997.
- ALLBROOK, D. Skeletal muscle regeneration. **Muscle Nerve**, v.4, n.3, p.234-45, 1981.
- ALMEIDA, S. S.; NASCIMENTO, P. C. B. D.; QUAIOTI, T. C. B. Quantidade e qualidade de produtos alimentícios anunciados na televisão brasileira. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, vol. 36, n.3, Jun., 2002.
- ALVES, A. P.; DAMASO, A. R.; DAL-PAI, V. Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre a morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular estriado esquelético em ratos. **J. Pediat.**, v.84, n.3, p.264-271, 2008.
- ALVES, J. S. M.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS-JÚNIOR, F. F. U.; CARLOS, P. S.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; CECCATTO, V. M.; BARBOSA, R. Limb immobilization alters functional electrophysiological parameters on sciatic nerve. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 8, p. 715-721, 2013.
- AMMANN, P.; BOURRIN, S.; BONJOUR, J. P.; MEYER, J. M.; RIZZOLI, R. Protein undernutrition-induced bone loss is associated with decreased IGF-I levels and estrogen deficiency. **J. Bone Miner. Res.**, v.15, p.683-690, 2000.
- AMMANN, P.; RIZZOLI, R.; MEYER, J. M.; BONJOUR, J. P. Bone density and shape as determinants of bone strength in IGF-I and/or pamidronate-treated ovariectomized rats. **Osteoporos. Int.**, v.106, p.219-227, 1996.
- APPELL, H. J.; SOARES, J. M. C. Adaptação muscular ao exercício físico. Livros Horizonte, Lisboa, 1990.
- ARMSTRONG, R. B. Initial events in exercise-induced injury. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.22, p.429-435, 1990.
- ARRINGTON, E. D.; MARK, D.; MILLER, M. D.; Skeletal muscles injuries. **Orthop. Clin. North. Am.**, v.26, n.3, p.411-423, 1995.
- ARMSTRONG, R. B.; DUAN, C.; DELP, M. D.; HAYES, D. A.; GLENN, G. M.; ALLEN, G. D. Elevations in rat soleus muscle (Ca) with passive stretch. **J. Appl. Physiol.**, v.74, p.2990-2997, 1993.

ARMSTRONG, R. B.; WARREN, G. L.; WARREN, J. A. Mechanisms of exercise-induced muscle fiber injury. **Sports Med.**, v.12, p.184-207, 1991.

BATISTA, T. M.; RIBEIRO, R. A.; AMARAL, A. G.; DE OLIVEIRA, C. A.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M. Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced insulin secretion in islets from lowprotein diet rats: involvement of Ach-M3R, Synt 1 and SNAP- 25 proteins. **J. Nutr. Biochem.**, v.23, p.306-312, 2012.

BAPTISTA, S. J. Repercussões morfológicas no timo de ratos jovens submetidos a desnutrição proteica e a renutrição precocemente corrigida. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de ciências biomédicas da universidade de São Paulo, 2008.

BARBACENA, M. M. Equilíbrio postural em crianças com obesidade e sobrepeso de 7 a 14 anos de idade. **[Dissertação de Mestrado]**. Programa de pós-graduação em Educação Física, Universidade de Brasília – UNB, 2011.

BAR-SHAI, M.; CARMELI, E.; COLEMAN, R.; ROZEN, R.; PEREK, S.; FUCHS, D.; REZNICK, A.Z. The effect of hindlimb immobilization on acid phosphatase, metalloproteinases and nuclear factor-kappaB in muscles of young and old rats. **Mech. Ageing. Dev.**, vol.126 n.2 p.289-97, 2005.

BARROS, K. M.; 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. **Nut. Neurosc.**, v.9, n.1-2, p.99-104. 2006.

BARUKI, S. B. S.; ROSADO, L. E. F.; ROSADO, G. P.; RIBEIRO, R. C. L. Associação entre estado nutricional e atividade física em escolares da Rede Municipal de Ensino em Corumbá – MS. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.12, n.2, p.90-94, 2006.

BASSUK, S. S.; MANSON, J. E. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. **J. Appl. Physiol.**, v.99, n.3, p.1193-1204, 2005.

BELL, G. L.; KAYANO, T.; BUSE, J. B.; BURANT, C. F.; TAKEDA, J.; LIN, D. Molecular biology of mammalian glucose transporter. **Diabetes Care.**, v.13, p.198-208, 1990.

BENTO-SANTOS A.; SILVEIRA, L. R.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; LEANDRO, C. G. Desnutrição perinatal e o controle hipotalâmico do comportamento alimentar e do metabolismo do músculo esquelético. **Rev. Nutr.**, v.25, n.3, p.403-413, 2012.

BERTOLINI, S. M. M. G.; OLIVEIRA, P. D.; CARARO, D. C.; Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos da linhagem *Winstar* pós-imobilização articular. **Acta. Sci. Health. Sci.**, v.32, n.1, p.23-27, 2010.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W. G.; BODDEN, M. K.; WINDSOR, L. J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DE CARLO, A.; Matrix metalloproteinases: a review. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v.4, p.197-250, 1993.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; LIMONGELLI, F. M. Creatine Kinase monitoring in sport medicine. **Br. Med. Bull. Adv.**, v.81-82, p.209-230, 2007.

BOOTH, F. W. Effect of immobilization on skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v.52, p.1113-1118, 1982.

BURANT, C. F. Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v. 47, p. 349-88, 1991.

BYRD, S. K. Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v.24, p.531-536, 1992.

CAHILL, B. R.; MISNER, J. E.; BOILEAU, R. A. The clinical importance of the anaerobic energy system and its assessment in human performance. **Am. J. Sports Med.**, v.25, n.6, p.63-872, 1997.

CAIERÃO, Q.M.; TEODORI, R.M; MINAMOTO, V.B. A influência da imobilização sobre o tecido conjuntivo muscular: uma revisão. **Fisioter. Mov.**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 87-92, jul./set. 2007.

CAIOZZO, V. J.; HADDAD, F.; BAKER, M. J.; HENRRICK, R. E.; PRITTO, N.; BALDWIN, K. M. Microgravity induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v.81, n.1, p.123-132, 1996.

CANALIS, E.; AGNUSDEI, D. Insulin-like growth factors and their role in osteoporosis. **Calcif. Tissue Int.**, v.58, p.133-134, 1996.

CAPELLI, A. P.; ZOPPI, C. C.; BARBOSA-SAMPAIO, H. C.; COSTA-Jr, J. M.; PROTZEK, A. O.; MORATO, P. N.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M. Taurine-induced insulin signalling improvement of obese malnourished mice is associated with redox balance and protein phosphatases activity modulation. **Liver Int.**, v.34, n.5, p.771-783, 2013.

CARMELI, E.; HAIMOVITCH, T. G. The expression of MMP-2 following immobilization and high-intensity running in plantaris muscle fiber in rats. **Sci.World J.**, v.6, p.542-550, 2006.

CARMELI, E., MOAS, M.; LENNON, S.; POWERS, S. K. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. **Exp. Physiol.**, v.90, n.4, p.613-619, 2005.

CARMELI, E.; MOAS, M.; REZNICK, A. Z.; COLEMAN, R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, v.29, n.2, p.191-197. 2004.

CARVALHO, L.C.; SHIMANO, A.C.; PICADO, C.H.F. Estimulação elétrica neuromuscular e o alongamento passivo manual na recuperação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio imobilizado. **Acta Ortop. Bras.**, v.16, n.3, p.161-164, 2008.

CHINGUI, L. J. Resposta fisiológica de músculos esqueléticos de ratos na fase aguda da imobilização do tornozelo na posição de 90°. **Dissertação de mestrado**. Universidade metodista de Piracicaba, 2008.

CLINE, G. W.; PETERSEN, K. F.; KRSSAK, M.; SHEN, J.; HUNDAL, R. S.; TRAJANOSKI, Z.; INZUCCHI, S.; DRESNER, A.; ROTHMAN, D. L.; SHULMAN, G. I. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. **N. Engl. J. Med.**, v.341, n.4, p.240-246, 1999.

COHEN, I.; BOGIN, E.; CHECHICK, A.; RZETELNY, V.; Biochemical alterations secondary to disuse atrophy in the rat's serum and limb tissues. **Arch. Orthop Trauma Surg.**, v.119, p.410-17, 1999.

COMPSTON, J. E.; LASKEY, M. A.; CROUCHER, P. I.; COXON, A.; KREITZMAN, S. Effect of diet-induced weight loss on total body bone mass. **Clin. Sci. (Lond)**, v.82, n.4, p.429-32, 1992.

CORNWALL, M. W. Biomechanics of non-contractile tissue: a review. **Phys. Ther.**, v.63, p.1869-1873, 1984.

COUPE, B.; GRIT, I.; DARMAUN, D.; PARNET, P. The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.97, n.3, p.R813-824, 2009.

CUPPARI, L. **Nutrição clínica no adulto**. In: Guias de medicina ambulatorial e hospitalar. UNIFESP- Escola Paulista de Medicina. Editora Manole, São Paulo, 2002.

DELFINO, G. B.; DURIGAN, J. L. Q.; CANCELLIERO, K. M.; SILVA, C. A. Efeito do sulfato de vanadil sobre o comprometimento metabólico muscular induzido pela imobilização de membro posterior de ratos. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.12, n.6, p.356-360, 2006.

DE SOUZA, C. T.; ARAUJO, E. P.; STOPPIGLIA, L. F.; PAULI, J. R.; ROPELLE, E.; ROCCO, S. A.; MARIN, R. M.; FRANCHINI, K. G.; CARVALHEIRA, J.B.; SAAD,

M. J.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; VELLOSO, L. A. Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. **FASEB J.**, v.21, p.1153-1163, 2007.

D'HONDT, E.; DEFORCHE, B.; DE BOURDEAUDHUIJ, I.; LENOIR, M. Childhood obesity affects fine motor skill performance under different postural constraints. **Neurosc. Lett.**, vol.440, n.1, p.72-75, 2008.

DIAS, C. N. K.; SILVA, C. A.; GUIRRO, R.; CANCELLIERO, K. M.; CHINGUI, L. J. Imobilização em flexão plantar do tornozelo induz alteração metabólica em músculo esquelético de ratos. **Fisioter. Bras.**, v.6, n.4, p.277-280, 2005.

DITTMER D. K.; TEASELL R. Complications of Immobilization and bed rest. Part 1: Musculoskeletal and cardiovascular complications. **Can. Fam. Physician.**, v.39, p.1428-1432, 1435-14377, 1993.

DURANT, R. H.; BARANOWSKI, T.; JOHNSON, M.; THOMPSON, W. O. The relationship among television watching, physical activity, and body composition of young children. **Pediatrics**, vol.94, n.4, p.449-455, 1994.

DURIGAN, J. L. Q.; CANCELLIERO, K. M.; DIAS, C. N. K.; SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; POLACOW, M. L. O. Efeitos da imobilização articular aguda nos músculos do membro posterior de ratos: análise metabólica e morfométrica. **Fisioter. Pesqui.**, v.13, n.2, p.38-45, 2006.

DURIGAN, J. L. Q.; CANCELLIERO, K. M.; DIAS, C. N. K.; SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; POLACOW, M. L. O. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização aguda associado à estimulação elétrica neuromuscular., **Rev. Fisiot. Mov.**, v.19, p.117-126, 2006.

EDGERTON, W. R.; ROY, R. R. Neuromuscular adaptations to actual and simulated spaceflight. In: Handbook of Physiology. Environmental Physiology. Bethesda, MD: **Am. Physiol. Soc.**, v.1, p. 721-763, 1996.

ENGLE, P. L. Maternal work and child care strategies in Periurban Guatemala: nutritional effects. **Child. Dev.**, v.62, p.954-965, 1991.

ESCOBAR, F.; Relação entre Obesidade e Diabete Mellitus Tipo II em Adultos. **Cad. UniFOA**. Volta Redonda, ano IV, n. 11, dezembro 2009.

ESCODA, M.S.Q. Desnutrição: gravidade e cronicidade. [**Dissertação de mestrado**]. Universidade Federal do Rio Grande no Norte UFRN, 1989

EXTON, J. H. Mechanism of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. **Diabetes Metab.**, v.3, p. 163-83, 1987.

FALEMPIN, M.; MOUNIER, Y. Muscle atrophy associated with microgravity in rat: basic data for countermeasures. **Acta Astronaut.**, v.42, p.489-502, 1998.

FERREIRA, R.; NEUPARTH, M.J.; ASCENSAO, A.; MAGALHAES, J.; DUARTE, J.; AMADO, F. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. **Rev. Port. Ciên. Desp.**, v. 4, n.3, p.94-111, 2004.

FERRUCCI, D. L. Efeito do exercício incremental exaustivo nas metaloproteínas 2 e 9 no músculo gastrocnêmio de ratos Wistar. [**Dissertação de mestrado**]. Programa de Biologia funcional e molecular. Universidade Estadual de Campinas, 2010.

FILIPUTTI, E.; FERREIRA, F.; SOUZA, K. L.; STOPPIGLIA, L. F.; ARANTES, V. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M. Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. **Life Sci.**, v.82, p.542-548, 2008.

FITTS, R.H.; RILEY D.R.; WIDRICK, J.J. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. **J. Exp. Biol.**, v.204, p.3201-08, 2001.

FOGELHOLM, G. M.; SIEVANEN, H. T.; KUKKONEN-HARJULA, T. K.; PASANEN, M. E. Bone mineral density during reduction, maintenance and regain of body weight in premenopausal, obese women. **Osteoporos. Int.**, v.12, n.3, p.199-206, 2001.

FOSCHINI, D.; PRESTES, J.; CHARRO, M. A. Artigo de revisão: Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. **Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum.**, v.1, p.101-106, 2007.

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. **Anim. Behav.**, v.13, p.234-241, 1965.

FRANCISCHI, R. P. P. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Rev. Nutr.** Campinas, vol. 13, n.1, p. 17-28, 2000.

FROST, H. M., Skeletal structural adaptation to mechanical usage (SATMU): 2. redefining Wolff's Law: the remodeling problem. **Anat. Rec.**, v.226, p.414-422, 1990.

FUKUSHIMA, K.; NAKAMURA, A.; UEDA, H.; YUASA, K.; YOSHIDA, K.; TAKEDA, S.; IKEDA, S. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog. **BMC Musculoskelet. Disord.**, v.8, p.54, 2007.

GARRETT, W. E. Jr. Muscle strain injuries. **Am. J. Sports Med.**, v.24, p.S2-S8, 1996.  
GIANNELLI, G.; ANTONACI, S. Gelatinases and their inhibitors in tumor metastasis: from biological research to medical applications. **Histol. Histopathol.**, v.17, p.339-345, 2002.

GIANELLI, G.; DE MARZO, A.; MARINOSCI, F.; ANTONACI, S. Matrix metalloproteinase imbalance in muscle disuse atrophy. **Histol. Histopathol.**, v.20, p.99-106, 2005.

GOODYEAR, L. J.; HIRSHMAN, M. F.; SMITH, R. J.; HORTON, E. S.; Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membrane of red and white skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v.261, p.556-61, 1991.

GOULD, J. A. Biomecânica básica na terapia esportiva e ortopédica. In: Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte. São Paulo: Manole, p.65-83, 1993.

GRAMSBERGEN, A. Posture and locomotion in the rat: Independent or interdependent development? **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.22, p.547-553, 1998.

GUYTON, A. C.; HALL, J. N. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

HADDAD, F.; ROY, R.R.; ZHONG, H.; EDGERTON, V.R.; BALDWIN, K.M. "Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits." **J. Appl. Physiol.**, v.95, n.2, p.791-802, 2003.

HAEUSLER, G.; WALTER, I.; HELMREICH, M.; EGERBACHER, M. Localization of matrix metalloproteinases, (MMPs) their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeletal maturation. **Calcif. Tissue Int.**, v.76, n.5, p.326-335, 2005

HANSEN, M. J.; JOVANOVSKA, V.; MORRIS, M. J. Adaptive responses in hypothalamic neuropeptide Y in the face of prolonged high-fat feeding in the rat. **J. Neurochem.**, v.88, n.4, p.909-916, 2004.

HASTY, K. A.; POURMOTABBED, T. F.; GOLDBERG, G. I.; THOMPSON, J. P.; SPINELLA, D. G.; STEVENS, R. M.; MAINARDI, C. L. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v.265, n.20, p.11421-11424, 1990.

HENRIKSEN, E. J.; ROODNICK, K. J. ; MONDON, C. E.; JAMES, D. E.; HOLLOSZY, J. O. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle. **J. Appl. Physiol.**, v.70, p.2322-2327, 1991.

HERBERT, R. D.; BALNAVE, R. J. The effect of position of immobilization on resting length, resting stiffness, and weight of the soleus muscle of the rabbit. **J. Orthop. Res.**, v.11, p.358-66, 1993.

HILL, R. B.; LAVIA, M. F. Principles of pathobiology. Third edition Oxford University Press, inc. New York. Oxford, 1980.

HIROSE, M.; KANEKI, M.; SUGITA, H.; YASUHARA, S.; MARTYN, J. A. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.279, p. 1235–41, 2000.

HORTOBAGYI, T.; DENAHAN, T. Variability in creatine kinase: methodological, exercise and clinically related factors. **Int. J. Sports Med.**, v.10, n.22, p.69-80, 1989.

IFRPI. Fome no mundo: Índice Global da Fome – GHI. **Geografia PD**. Guarujá, outubro, 2010.

ISLEY, W. L.; UNDERWOOD, L. E.; CLEMMONS, D. R. Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in humans. **J. Clin. Invest.**, v.71, p.175–182, 1983.

ITAI, Y.; KARIYA, Y.; HOSHINO, Y.; Morphological changes in rat hindlimb muscle fibers during recovery from disuse atrophy. **Acta Physiol. Scand.**, n.181, p.217-324, 2004.

JANICKA, A.; WREN, T. A.; SANCHEZ, M. M.; DOREY, F.; KIM, P. S.; MITTELMAN, S. D.; GILSANZ, V. Fat mass is not beneficial to bone in adolescents and young adults. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.92, n.1, p.143-147, 2007.

JÄRVINEN, M. J.; EINOLA, S. A.; VIRTANEN, E. O. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v.73, n.3, p.253-7, 1992.

JANSEN, J. E.; JENSEN, T. G.; SMITH, T. K.; JOHNSTON, D. A.; DUDRICK, S. J. Nutrition in orthopedic surgery. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v.64, p.1263–1272, 1982.

Ji, L. L. Oxidative stress during exercise: implications of antioxidants nutrients. **Free Radic. Biol. Med.**, v.8, p.1079-1086, 1995.

JOKL, P.; KONSTADT, S. The effect of limb immobilization on muscle function and protein composition. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.3, p.222-229, 1983.

KASPER, C. E.; TALBOT, L. A.; GAINES, J. M. Skeletal muscle damage and recovery. **AACN Clin. Issues**, v. 13, no. 2, p. 237-247, 2002.

KANEPS, S. J.; STOVER, S. M.; LANE, N. E. Changes in canine cortical and cancellous bone mechanical properties following immobilization and remobilization with exercise. **Bone**, v.21, p.419-423, 1997.

KAUHANEN, S.; LEIVO, I.; MICHELSSON, J. E. Early muscle changes after immobilization. An experimental study on muscle damage. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 297, p. 44-50, 1993.

KHERIF, S.; LAFUMA, C.; DEHAUPAS, M.; LACHKAR, S.; FOURNIER, J. G.; VERDIERE-SAHUQUE, M.; FARDEAU, M.; ALAMEDDINE, H. S. "Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles." **Dev. Biol.**, vol. 205, n.1 p.158-70, 1999.

KIERNAN, J.A. Histological and Histochemical methods. Theory and practice. 3 ed. **Oxford: Pergamon Press**, p.81-82, 1981.

KIM, J.; KIM, B. Differential Regulation of MAPK Isoforms during Cast- Immobilization- Induced Atrophy in rat Gastrocnemius muscle. **J. Phys. Ther. Sci.**, v. 22, p. 217-22, 2010.

KIMBALL, S.R.; VARY, T.C.; JEFFERSON, L.S. Regulation of protein synthesis by insulin. **Annu. Rev. Physiol.**, v.56, p. 321-48, 1994.

KIRATLI, B. J. Immobilization osteopenia. In: Marcus, R., Feldman, D., Kelsey, J. (Eds.), Osteoporosis. **Academic Press**, New York, p.833–853, 1996.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol. Rev.**, v.84, n.2, p.649-698, 2004.

KLIP, A.; PAQUET, M. R. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. **Diabetes Care.**, v. 13, p. 228-43, 1990.

KONDO, H.; MIURA, M.; NAKAGAKI, I.; SASAKI, S.; HORI, S.; ITOKAWA, Y. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. **Am. J. Physiol.**, v.265, p.839-844, 1993.

KONDO, H.; MIURA, M.; NAKAGAKI, I.; SASAKI, S.; ITOKAWA, Y. Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. **Am. J. Physiol.**, v.265, p.583-590, 1992

KRISHNAMURTHY, N; BALAKUMAR, B; THOMBRE, D.P. Effects of under nutrition and sex difference on skeletal muscle function in young rats Indian. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.36, p.234-238, 1992.

KUBO, K.; FOLEY, J. E.; Rate-limiting steps for insulin-mediated glucose uptake into perfused rat hindlimb. **Am. J. Physiol.**, v.250, p.E100-102, 1986.

KUME, K., SATOMURA, K.; NISHISHO, S.; KITAOKA, E.; YAMANOUCHI, K.; TOBIUME, S.; NAGAYAMA, M. Potential role of leptin in endochondral ossification. **J. Histochem. Cytochem.**, v.50, n.2, p.159-169, 2002.

LATARJET, M.; RUIZ-LIARD, A. Anatomia Humana. 2º Ed., São Paulo: Panamericana, 1996.

LECOQ, B.; POTREL-BURGOT, C.; GRANIER, P.; SABATIER, J.P.; MARCELLI, C. Comparison of bone loss induced in female rats by hindlimb unloading, ovariectomy, or both. **Joint Bone Spine.**, v.73, p.189–195, 2006.

LEIVO, I.; KAUKANEN, S.; MICHELSSON, J. A. Abnormal mitochondria and sarcoplasmic changes in rabbit skeletal muscle induced by immobilization. **APMIS**, v. 106, p.1113-1123, 1998.

LIMA, M. S. C. H. Efeito da dieta hipoprotéica na formação e composição de estruturas dentaria. Estudos experimentais em ratos winstar. [**Dissertação de mestrado**]. Departamento de bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2003.

LIMA-SILVA, A.E.; FERNANDES, T.C.; DE-OLIVEIRA, F.R.; NAKAMURA, F.Y.; GEVAERD, M. S.; Metabolismo do glicogênio muscular durante o exercício físico: mecanismos de regulação. **Rev. Nutr. [online]**. vol.20, n.4, pp. 417-429. ISSN 1415-5273, 2007.

LOITZ, B. J.; ZERNICKE, R. F.; VAILAS, A. C.; KODY, M. H.; MEALS, R. A. Effects of short-term immobilization versus continuous passive motion on the biomechanical and biochemical properties of the rabbit tendon. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.244, p.265 71, 1989.

LUCIANO, E.; CARNEIRO, E. M.; REIS, M. A .B.; PERES, S. B.; VELLOSO, L. A.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J. A. Endurance training modulates early steps of insulin signaling in rat muscle. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.30, p.S24, 1998.

LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteínas em musculo de ratos diabéticos experimentais. **Rev. Paul. Educ. Fis.** São Paulo, v.12, n.2, p.202-209 jul./dez, 1998.

MACHIDA S.; BOOTH, F. W. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v.36, n.52-59, 2004.

MALINA, R. M.; BOUCHARD C.; BAR-OR, O. Crescimento, maturação e atividade física. Ed. Phorte: SP, 2009.

MARIMUTHU, K.; MURTON, A. J.; GREENHAFF, P. L. Mechanisms regulating muscle mass during disuse atrophy and rehabilitation in humans. **J. Appl. Fisiol.**, v.110, n.2, p.555-560, 1985.

MARQUETI, R. C.; PRESTES, J.; PASCHOAL, M.; RAMOS, O. H.; PEREZ, S. E.; CARVALHO, H. F.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. **Eur J Appl Physiol.**, v.104, p.1087-1093, 2008.

MARTINS, I.S.; MARINHO, S.P.; O potencial diagnóstico dos indicadores da obesidade centralizada. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, Vol.37, n.6, p.760-767. 2003.

MATOS, F. R.; VASCONCELOS, R. G.; QUEIROZ, L. M. G.; FREITAS, R. A.; Expressão de MMPs, marcadores angiogênicos e proliferação celular em tumores ontogênicos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.48, n.5, p.375-381, 2012.

MATRISIAN, L. M. The matrix-degrading metalloproteinases. **Bioessays**, v.14, n.7, p.455-63, 1992.

MATTIELLO-SVERZUT, A. C.; CARVALHO, L. C.; CORNACHIONE, A.; NAGASHIMA, M.; NEDER, L.; SHIMANO, A. C. Morphological effects of electrical stimulation and intermittent muscle stretch after immobilization in soleus muscle. **Histol. Histopathol.**, v.21, p.957-964, 2006.

MCMAHON, M. M.; BISTRIAN, B. R. The physiology of nutritional assessment and therapy in protein-calorie malnutrition. **Dis. Mon.**, v.36, p.373-417, 1990.

MELLO, E. D.; LUFT, V. C.; MEYER, F.; Atendimento ambulatorial individualizado versus programa de educação em grupo: qual oferece mais mudanças de hábitos alimentares e de atividade física em crianças obesas? **J. Pediatr.** Rio de Janeiro, Vol. 80, n.6, 2004.

MEZADRI, T. J.; ORTOLAN, X. R.; THIEMA, A. L.; PIACENTINI, N.; AMARAL, V. L. L.; FRAJBLAT, M. Avaliação do comportamento de ratos alojados em caixas de cores diferentes. **Rev. Etolog.**, v.10, n.1, p.21-26, 2011.

MINAIRE, P. Immobilization osteoporosis. A Review. **Clin. Rheumatol.**, v.8, p.95-103, 1989.

MONTE, C.M.G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. **J. Pediatr.**, v.76, n.3, p. 285-297, 2000.

MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. **Estud. Av.**, v.17, n.48, 2003.

MONTGOMERY, A. M.; SABZEVARI, H.; REISFELD, R. A. Production and regulation of gelatinase B by human T-cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1176, n.3, p.265-268, 1993.

MUSACCHIA, X. J.; STEFEN, J. M.; FELL, R. D. Disuse atrophy of skeletal muscle: animal models. **Exerc. Sport Sci.Ver.**, v.16, p.61-87, 1988.

MUSEY, V. C.; GOLDSTEIN, S.; FARMER, P. K.; MOORE, P. B.; PHILLIPS, L. S. Differential regulation of IGF-1 and IGF-binding protein-1 by dietary composition in humans. **Am. J. Med. Sci.**, v.305, p.131-138, 1993.

NAGASE H.; WOESSNER J.F. Jr. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.21491-21494, 1999.

NAGY, Z. M.; PORADA, K. J.; ANDERSON, J. A. Undernutrition by rearing in large litters delays the development of reflexive, locomotor, and memory processes in mice. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v.91, p.682-696, 1977.

NAHAS, T. R. O teste do campo aberto. In: Xavier, GF (Editor), Técnicas para o estudo do sistema nervoso. São Paulo: Editora Plêiade; 1999.

NASCIMENTO, O. J.; MADI, K.; GUEDES E SILVA, J. B.; SOARES FILHO, P. J.; HAHN, M. D.; COUTO, B.; FREITAS, M. R. G. Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição protéica. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v.48, n.395-402, 1990.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, v.6, n.3, p.173-82. 2006.

NEWMAN, A. B.; HAGGERTY, C. L.; GOODPASTER, B.; HARRIS, T.; KRITCHEVSKY, S.; NEVITT, M.; MILES, T. P.; VISSER, M. Strength and muscle quality in a well-functioning cohort of older adults: the health, aging and body composition study. **J. Am. Geriatr. Soc.**; v.51, n.3, p.323-30, 2003.

NORMAN, K.; STOBÄUS, N.; GONZALEZ, M. C.; SCHULZKE, J. D.; PIRLICH, M. Hand grip strength: outcome predictor and marker of nutritional status. **Clin. Nutr.**, v.30, n.2, p.135-42, 2011.

NOVELLI, E.L.B.; DINIZ Y.S.; GALHARDI, C.M.; EBAID, G.M.X.; RODRIGUES, H.G.; MANI, F.; Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab. Anim.** V.41 p.111-119. 2007

NOYES, F. R. Functional properties of knee ligaments and alterations induced by immobilization: a correlative biomechanical and histological study in primates. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.123, p.210-242, 1977.

NUNES, M. L.; BATISTA, B. B.; MICHELI, F.; BATISTELLA, V. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. **J. Pediatr.**, v.78, p.39-44, 2002.

O'BRIEN, R.M.; GRANNER, D.K. Regulation of gene expression by insulin. **Biochem. J.**, v.278, p.609-19, 1991.

OHTAKE, Y.; TOJO, H.; SEIKI, M. Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle. **J. Cell. Sci.**, v.119, p.3822-3832, 2006.

OLIVEIRA, F. L.; OLIVEIRA, A. S.; SCHIMIDT, B.; AMÂNCIO, O. M. Desnutrição energética intrauterina em ratos: alterações musculo-esqueléticas na 1ª e 2ª gerações. **J Pediat.**, v.75, p.350-356, 1999.

ONO, T.; MAEKAWA, K.; WATANABE, S.; OKA, H.; KUBOKI, T. Muscle contraction accelerates IL-6 mRNA expression in the rat masseter muscle. **Arch. Oral Biol.**, p.479-486, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAUDE, Joint FAO/WHO expert committee on nutrition, 6th report, OMS. **Rep. Ser.**, n.45, 1962.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Obesidade e sobrepeso. **Nota Descritiva Nº 311**, maio de 2012.

OZANNE, S. E.; JENSEN, C. B.; TINGEY, K. J.; STORGAARD, H.; MADSBAD, S.; VAAG, A. A. Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. **Diabetologia**, v.48, n.3, p.547-552, 2005.

OZANNE, S. E.; OLSEN, G. S.; HANSEN, L. L.; TINGEY, K. J.; NAVE, B. T.; WANG, C. L.; HARTIL, K.; PETRY, C. J.; BUCKLEY, A. J.; MOSTHAF-SEEDORF, L. Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. **J. Endocrinol.**, v.177, n.2, p.235-241, 2003.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Bio.**, v.8, n.3, p.221-233, 2007.

PAIXÃO, A.P.S.; ALVES, E.G.L.; BITENCOURT, A.C.V.; JUNIOR, J.D.C.; VASCONCELOS, A.S.; Padronização da técnica de imobilização do membro pélvico para estudo da atrofia muscular esquelética em ratos. **J. Bras. Ciên. Ani.**, v.4, n.7, p.274-291, 2011.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. L. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v.4, n.8, p.617-629, 2004.

PATRÍCIO, F. R.; NÓBREGA, F. J.; TONETE, S. S. Desnutrição intrauterina em diferentes períodos de gestação em ratas: estudo do intestino delgado proximal ao nascimento e durante a recuperação nutricional. **Rev. Paul. Ped.**, v.2, p.43-52, 1984.

PAVESI, V. C. S. Efeito da criolesão no remodelamento da matriz extracelular em músculo esquelético de rato. **[Dissertação de mestrado]**. Programa de ciências da reabilitação. Universidade Nove de Julho. São Paulo, 2008.

PELIZZARI, C.; MAZZANTI, A.; RAISER, A. G.; LOPES, S. T. A.; GRAÇA, D. L.; SALBEGO, F. Z.; ZANINI, F.; RAMOS, A. T.; FESTUGATTO, R.; BECKMANN, D. V.; DA-CUNHA, M. M.; DOS-SANTOS, R. P.; CARGNELUTTI, J. F.; PEREIRA, D. T.;

MARTINS, T. B. Estimulação elétrica neuromuscular de média frequência (rusa) em cães com atrofia muscular induzida. **Ciênc. Rural**, v.38, n.3, p.736-742, 2008.

PINHO, R.; PETROSKI, E. L. Adiposidade corporal e nível de atividade física em adolescentes. **Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum.**, vol.1, n.1, p.60-68, 1999.

PLOUG, T.; OHKUWA, T.; HANDBERG, A.; VISSING, J.; GALBO, H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v.268, n.32, p.980- 986, 1995.

PORTINHO, D.; BOIN, V. G.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos sobre o tecido ósseo e cartilagem articular provocados pela imobilização e remobilização em ratos *winstar*. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.14, n.5, p.408-411, 2008.

PTERMANN, C. E. D.; CANCELLIERO, K. M.; SILVA, C. A. Tratamento com nifedipina, um bloqueador de canais de cálcio, melhora o conteúdo muscular de glicogênio de membro imobilizado de ratos. **Rev. Bras. Fisioter.**, v.9, n.2, p.181-186, 2005.

REARDON, K.A.; DAVIS, J.; KAPSA, R.M.I.; CHOONG, P.; BYRNE, E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. **Musc. Nerv.**, v.24, n.7, p.893-899, 2001.

RECINE, E.; RADAELLI, P. Obesidade e desnutrição. Brasília: **NUT/FS/UnB**, 2001.

REEVES, P. G., F. H. NIELSEN, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

REID, I. R. Relationships among body mass, its components, and bone. **Bone**, v.31. p.547–555, 2002.

REZNICK, A. Z.; MENASHE, O.; BAR-SHAI, M.; COLEMAN, R.; CARMELI, E. Expression of matrix metalloproteinase, inhibitor and acid phosphatase in muscle of immobilized hind limb of rats. **Muscle Nerve**, v.27, p.51-59, 2003.

RIBEIRO, L. C.; RODRIGUES, L.; QUINCOZES-SANTOS, A.; TRAMONTINA, A. C.; BAMBINI-JUNIOR, V.; ZANOTTO, C.; DIEHL, L. A.; BIASIBETTI, R.; KLEINKAUF-ROCHA, J.; DALMAZ, C.; GONÇALVES, C. A.; GOTTFRIED, C. Caloric restriction improves basal redox parameters in hippocampus and cerebral cortex of Wistar rats. **Brain Res.**, v.1472, p.11-19, 2012.

RIBEIRO, R. A.; SANTOS-SILVA, J. C.; VETTORAZZI, J. F.; COTRIM, B. B.; MOBIOLLI, D. D.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M. Taurine supplementation prevents morphophysiological alterations in high-fat diet mice pancreatic beta-cells. **Amino Acids.**, v.43, n.4, p.1791-1801, 2012.

RICCI, T. A.; CHOWDHURY, H. A.; HEYMSFIELD, S. B.; STAHL, T.; PIERSON, R. N. Jr.; SHAPSES, S. A. Calcium supplementation suppresses bone turnover during weight reduction in postmenopausal women. **J. Bone Miner. Res.**, v.13, n.6, p.1045-1050, 1998.

ROACH, D. M.; FITRIDGE, R. A.; LAWS, P. E.; MILLARD, S. H.; VARELIAS, A.; COWLED, P. A. Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v.23, n.3, p.260-269, 2002.

ROSEN, C. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the senescent skeleton: Ponce de Leon's fountain revisited. **J. Cell. Biochem.**, v.56, p.348-356, 1994.

ROWE, R. W. D. Effect of low nutrition on size of striated muscle fibers in the mouse. **J. Exp. Zool.**, v.167, p.353-358, 1968.

SALVINI, T.F. Plasticidade e adaptação postural dos músculos esqueléticos. In: Marques, A.P. Cadeias musculares: um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global. São Paulo: Manole; 2000. p.3-14.

SANTOS F. Desnutrição infantil. Programa posto de puericultura Suzane Jacob. Nov. 2010. Disponível em: <http://www.ppsj.org.br/desnutricao-infantil/>. Acesso em: 28/08/2013.

SANTOS-JUNIOR, F. F. U.; Avaliação músculo esquelética e de genes marcadores em ratos diabéticos com imobilização de pata. **Dissertação (Mestrado)**. Ciências fisiológicas, Universidade estadual do Ceará, 2010.

SANTOS-JUNIOR F. F. U.; ALVES, J. S. M.; MACHADO, A. A. N.; CARLOS, P. S.; FERRAZ, A. S. M.; BARBOSA, R.; LEAL-CARDOSO, J. H.; CECATTO, V. M. Alterações morfométricas em músculo respiratório de ratos submetidos à imobilização de pata. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.16, n.3, p.215-218, 2010.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro, Vol. 19, Sup.1, p. 29-36. 2003.

SCHURCH, M. A.; RIZZOLI, R.; SLOSMAN, D.; VADAS, L.; VERGNAUD, P.; BONJOUR, J. P. Protein supplements increase serum insulin-like growth factor-I levels and attenuate proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Ann. Intern. Med.**, v.128, p.801- 809, 1998.

SHAPSES, S. A.; VON THUN, N. L.; HEYMSFIELD, S. B.; RICCI, T. A.; OSPINA, M.; PIERSON, R. N. Jr.; STAHL, T. Bone turnover and density in obese premenopausal women during moderate weight loss and calcium supplementation. **J. Bone. Miner. Res.**, v.16, n.7, p.1329-1336, 2001.

SHIRAEV, T.; CHEN, H.; MORRIS, M. J. Differential effects of restricted versus unlimited high-fat feeding in rats on fat mass, plasma hormones and brain appetite regulators. **J. Neuroendocrinol.**, v.21, n.7, p.602-609. 2009.

SILVA, A. V.; VOLPON, J. B. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. **Acta Ortop. Bras.** [online], vol.12, n.1, p.22-31, 2004.

SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; JUNIOR, R. M.; LIBARDI, J. Comportamento de ratos imobilizados na posição de 90° do tornozelo e submetidos à estimulação elétrica muscular. **Rev. Ciênc. Méd.**, v.18, n.5/6, p.251-258, 2009.

SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J.; POLACOW, M.L.O.; DURIGAN, J.L.Q. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.39, n.18, p.979-985, 2006.

SIU, L.O.; RUSSELL, J. C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.**; v.28 ;p.234-236, 1970.

SLIMANI, L.; MICOL, D.; AMAT, J.; DELCROS, G.; MEUNIER, B.; TAILLANDIER, D.; POLGE, C.; BÉCHET, D.; DARDEVET, D.; PICARD, B.; ATTAIX, D.; LISTRAT, A.; COMBARET, L. The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post-immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis, and apoptosis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.303, n.11, p.E1135-1147, 2012.

SORICHTER, S.; MAIR, J.; KOLLER, A.; GEBERT, W.; RAMA, D.; CALZOLARI, C.; ARTNER-DWORZAK, E.; PUSCHENDORF, B. Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage. **J. Appl. Physiol.**, v. 83, n.4, p.1076-1082, 1997.

SOUZA, M. Z.; LUCIANO, E. Metabolismo e crescimento de ratos diabéticos submetidos ao treinamento físico. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.40, p.73, 1996.

ST-AMAND, J.; OKAMURA, K.; MATSUMOTO, K.; SHIMIZU, S.; SOGAWA, Y. Characterization of control and immobilized skeletal muscle: an overview from genetic engineering. **FASEB J.**, v.15, p.791-802, March 2001.

STAHLE-BACKDAHI, M.; INOUE, M.; GUIDICE, G. J.; PARKS, W. C. 92-KD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-KD bullous pemphigoid autoantigen. **J. Clin. Invest.**, v.93, n.5, p.2022-2030, 1994.

STEINDL, R.; KUNZ, K.; SCHROTT-FISCHER, A.; SCHOLTZ, A. W. Effect of age and sex on maturation of sensory systems and balance control. **Dev. Med. Child. Neurol.**, vol.48, n.6, p.477-482, 2006.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.17, p.463-516, 2001.

STICKLAND, N. C.; WIDDOWSON, E. M., GOLDSPIK, G. Effects of severe energy and protein deficiencies on the fibres and nuclei in skeletal muscle of pigs. **Br. J. Nutr.**, v.34, p.421-428, 1975.

STRONGIN, A. Y., COLLIER, I.; BANNIKOV, G.; MARMER, B. L.; GRANT, G. A.; GOLDBERG, G. I. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. **J. Biol. Chem.**, v.270, n.10, p.5331-5338, 1995.

TAKATA, T. E.; VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v.10, p.321-25, 2000.

TALMADGE, R. J. Mechanical properties of rat soleus after long-term spinal cord transection. **J. Appl. Physiol.**, v.93, n.4, p.1487-1497, 2002.

TANAKA, T.; KARIYA, Y.; HOSHINO, Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. **J. Orthop Sci.**, v.9, n.12, p.76-85, 2004.

THISSEN, J. P.; DAVENPORT, M. L.; PUCILOWSKA, J. B.; MILES, M. V.; UNDERWOOD, L. E. Increased serum clearance and degradation of 125I-labeled IGF-I in protein-restricted rats. **Am. J. Physiol.**, v.262, p.E406-E411, 1992.

THISSEN, J. P.; KETELSLEGERS, J. M.; UNDERWOOD, L. E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. **Endocr. Rev.** v.15, p.80-101, 1994.

TONUCCI, J.; TOLEDO, M. T. Obesidade induzida por glutamato monossódico em ratas Wistar prenhes adultas. **Rev. Eletr. Biologia.**, v.4, n.2, p.10-24, 2011.

TORUN, B.; CHEW, F. Protein energy malnutrition. In: SHILS, M.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. (Ed.) Modern nutrition in health and disease. **Philadelphia: Lea & Febiger**, v. 2, p.950-976, 1994.

TOSCANO, A. E.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition.**, v.24, n.3, p.270-278, 2008.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 6, 1969.

TREBACZ, H. Disuse-induced deterioration of bone strength is not stopped after free remobilization in young adult rats. **J. Biomech.**, v.34, p.1631-1636, 2001.

TRUMP, M. E.; HEIGENHAUSER, G. J.; PUTMAN, C. T.; SPRIET, L. L. Importance of muscle phosphocreatine during intermittent maximal cycling. **J. Appl. Physiol.**, v.80, p.1574-1580, 1996.

VADER, A. M.; WALTERS, S. T.; HARRIS, T. R.; HOELSCHER, D. M. Television Viewing and Snacking Behaviors of Fourth- and Eighth-Grade School children in Texas. **Prev. Chronic Dis.**, vol.6, n.3, 2009.

VANDEHAAR, M. J.; MOATS-STAATS, B. M.; DAVENPORT, M. L.; WALKER, J. L.; KETELSLEGERS, J. M.; SHARMA, B. K.; UNDERWOOD, L. E. Reduced serum concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in protein-restricted growing rats are accompanied by reduced IGF-I mRNA levels in liver and skeletal muscle. **J. Endocrinol.**, v.130, p.305–312, 1991.

VELKOSKA, E.; COLE, T. J.; MORRIS, M. J. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.288, n.6, p.E1236-1243, 2005.

VETTORAZZI, J. F.; RIBEIRO, R. A.; SANTOS-SILVA, J. C.; BORCK, P. C.; BATISTA, T. M.; NARDELLI, T. R.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M. Taurine supplementation increases KATP channel protein content, improving Ca<sup>2+</sup> handling and insulin secretion in islets from malnourished mice fed on a high-fat diet. **Amino Acids.**, May, 2014.

VICKERS, M. H.; BREIER, B. H.; CUTFIELD, W. S.; HOFMAN, P. L.; GLUCKMAN, P. D. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.279, n.1, p.83-87, 2000.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ. Res.**, v.92, n.8, p.827-839, 2003.

VOLPI, F. S.; CASAROLL, L. M.; PUDELL, C.; MENON, T.; CIENA, A. P.; ALVES, E. P. B.; Efeitos da Remobilização em Duas Semanas com Natação Sobre o Músculo Sóleo de Ratos Submetidos à Imobilização. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.14, n. 3, Mai/Jun., 2008.

VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R.; DUARTE, J. A. R. Atrofia muscular esquelética e modelos experimentais: Apoptose e alterações histológicas, bioquímicas e metabólicas. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esporte**, v.18, n.1, p.85-95, 2007.

WALTON, G. E.; BOWER, N. J.; BOWER, T. G. Recognition of familiar faces by newborns. **Inf. Behav. Develop.**, v.15, n.2, p.265–269, 1992.

WANG, M. C BACHRACH, L. K.; VAN LOAN, M.; HUDES, M.; FLEGAL, K. M.; CRAWFORD, P. B. The relative contributions of lean tissue mass and fat mass to bone density in young women. **Bone**, v.37, p.474–481, 2005.

WEARING, S. C.; HENNIG, E. M.; BYRNE, N. M.; STEELE, J. R.; HILLS, A. P. The impact of childhood obesity on musculoskeletal form. **Obes. Rev.**, vol.7, n.2, p.209-216, 2006.

WEINREB, M.; RODAN, G. A; THOMPSON, D. D. Osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone resorption and decreased bone formation. **Bone**, v.10, p.187-194, 1989.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilized muscle. **J. Anat.**, v.138, p.343-50, 1984.

WOESSNER, J. F. Jr. Matrix metalloproteinase and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J.**; v.5, p.2145-2154, 1991.

YEH, J. K; LIU, C. C; ALOIA, J. F. Effects of exercise and Immobilization on bone formation and resorption in young rats. **Am. J. Physiol.**, v.264, p.182-189, 1993.

ZHANG, P.; CHEN, X.; FAN, M.; Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. **Med. Hypotheses.**, v.69, p. 310-321, 2006.

ZHAO, L. J.; JIANG, H.; PAPASIAN, C. J.; MAULIK, D.; DREES, B.; HAMILTON, J. Correlation of obesity and osteoporosis: effects of fat mass on the determinant of osteoporosis. **J. Bone Miner. Res.**, v.23, n.1, p.17-29, 2008.

ZIMOWSKA, M.; BRZOSKA, E.; SWIERCZYNSKA, M.; STREMINSKA, W.; MORACZEWSKI, J. Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. **Int. J. Dev. Biol.**, v.52, n.2-3, p.307-314, 2008.



## ANEXOS

## I - TABELA DE COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS DIETAS.

Ingredientes (g/Kg)	Normoprotéica e normolipídica (AIN-93M)	Hipoprotéica (6% proteína)	Hiperlipídica (34% lipídeos)
Caseína	140	71,4	140
Amido de milho	465,7	511,9	208,7
Dextrina	155	178,6	100
Sacarose	100	100	100
L-cistina	1,8	0,6	1,8
Fibra (microcelulose)	50	50	50
Óleo de soja	40	40	40
Banha	-	-	312
Mistura de sais AIN93G*	35	35	35
Mistura de vitaminas* AIN93G	10	10	10
Cloridrato de colina	2,5	2,5	2,5

\* As misturas de sais minerais e vitaminas foram confeccionadas de acordo com a norma AIN-93 (REEVES & NIELSEN *et al.*, 1993).



**ANEXO II: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO ANIMAL.**

CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto "Efeito da imobilização do musculo triceps sural em animais obesos e desnutridos" (protocolo nº 2872-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari / Renato Rissi, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de outubro de 2012.

Campinas, 04 de outubro de 2012.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
PresidenteFátima Alonso  
Secretária Executiva

