
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE
BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA

***SPIRULINA* E EXERCÍCIO NA RECUPERAÇÃO DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA**

FABRÍCIO AZEVEDO VOLTARELLI

Tese de Doutorado apresentada
ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciências da Motricidade
(Biodinâmica da Motricidade
Humana).

Dezembro - 2008

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE
BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA

***SPIRULINA* E EXERCÍCIO NA RECUPERAÇÃO DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA**

FABRÍCIO AZEVEDO VOLTARELLI

Orientadora: Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello

Tese de Doutorado apresentada
ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciências da Motricidade
(Biodinâmica da Motricidade
Humana).

Dezembro - 2008

Dedicatória

Dedico a presente Tese de Doutorado aos meus queridos pais, Silvio Voltarelli e Elizabeth Azevedo Voltarelli. Obrigado pelo amor, carinho, confiança e apoio nesses anos todos e por abrirem mão de inúmeras coisas para a concretização do sonho de um filho. Vocês são pais exemplares e os amo muito.

A presente **Tese de Doutorado** foi desenvolvida no Departamento de Educação Física, IB, Unesp Campus Rio Claro, sob a orientação da **Prof^a. Dr^a. Maria Alice Rostom de Mello**, com Estágio no Exterior, Faculdade de Desporto, Universidade do Porto, Portugal, sob a orientação do **Prof^o. Dr^o. José Alberto Ramos Duarte***, e contou com o apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)****

Instituições Envolvidas:



Apoio Financeiro:



*Parecer do Orientador no Exterior sobre as Atividades do Bolsista – Vide Página

**Bolsa de Estudo – Modalidade PDEE (Processo nº. 3887/06-5)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e à Nossa Senhora da Aparecida por ter me iluminado com vontade, perseverança, força e acima de tudo saúde para finalizar o presente trabalho. Acredito que tudo isso tinha que acontecer em minha vida.

Faço um agradecimento especial à minha querida esposa Marisa. São mais de 7 anos juntos e muitas das coisas boas que aconteceram em minha vida devo à ela. Obrigado por ser essa pessoa cativante, linda, companheira e acima de tudo compreensiva. Espécie rara. Te amo demais e não imagino minha vida sem a sua presença...obrigado por existir!

Agradeço também à minha irmã Vanessa. Gostaria que você soubesse que sinto muito a sua falta e que os acontecimentos do próximo ano venham nos aproximar (fisicamente, pois espiritualmente somos bem próximos). Tenho muito orgulho de você e boa sorte nessa nova etapa de sua vida, a de Mestranda. Obrigado pelo seu carinho e apoio...amo você de coração maninha!

Aos meus queridos sogros Jurandyr e Jeane pelo apoio incondicional nesses anos todos. Obrigado por tudo e continuem sendo essas pessoas maravilhosas, cativantes e amigas.

Essa “etapa” dos agradecimentos, na verdade, dá-se início lá no ano 2000, quando ingressei em minha Iniciação Científica, atravessa o tempo e chega até o ano de 2005, quando concluí meu curso de Mestrado e culmina no presente ano, 2008, quando termino, aqui, meu curso de Doutorado. Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello, muitíssimo obrigado por esses 8 anos de convivência, ensinamentos, compreensão, companheirismo, paciência e auxílio (inclusive financeiro) nas horas em que mais necessitei. Me desculpe pelas coisas negativas, interpéries e ações que por uma ou outra razão não lhe agradaram. Obrigado de coração por tudo e que Deus continue colocando você em meu caminho e lhe iluminando e abençoando.

Agradeço aos membros da Banca Examinadora por colaborarem com suas sugestões e conhecimento para o presente trabalho.

Aos Técnicos do Laboratório de Biodinâmica da Unesp Campus Rio Claro, Eduardo Custódio (China), José Roberto Rodrigues (Betolândia) e Clarice Sibuya

pelo apoio nos diversos experimentos com os animais e pela convivência fora do ambiente de trabalho. Obrigado!

Agradeço a Seção de Pós-Graduação bem como os Coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Motricidade, em especial os Professores Doutores Claudio Alexandre Gobatto e Angelina Zanesco. Vocês contribuíram, em muito, para minha formação.

Ao pessoal da Biblioteca da Unesp Campus Rio Claro, que nesses quase 10 anos (contando Graduação e Pós-Graduação) sempre esteve pronto para me auxiliar.

Aos amigos (de verdade) da Pós-Graduação e Graduação, que fora os “trampos” do laboratório e ainda contribuírem para publicações na condição de co-autores em meus artigos, resumos e *abstracts*, tornaram-se pessoas muito especiais: Michel Araújo, Gustavo Araújo, Carla Ribeiro, Clecia Mota, Rodrigo Moura, José Alexandre Leme, José Diego Botezelli, Fúlvia Manchado-Gobatto e Leandro Moura (Guloso).

Faço um agradecimento especial ao meu amigo Ricardo Vinicius Ledesma Contarteze. Deus te levou de forma precoce dessa vida, talvez por estar precisando de você junto Dele. Gostaria de lhe agradecer pelos bons momentos de amizade (incluindo os papos sobre o Corinthians, música, etc, inúmeras “peladinhas” de futebol e rodízios de pizza) e trabalho que realizamos juntos. Descanse em paz e olhe por todos nós.

SUMÁRIO

	Páginas
1-RESUMO DA TESE	1
2-THESIS ABSTRACT	3
3-INTRODUÇÃO GERAL	5
4-OBJETIVOS	8
4.1- Objetivo geral.....	8
4.2- Objetivos específicos.....	8
5-REVISÃO DA LITERATURA	9
5.1- Desnutrição protéico-calórica: características gerais.....	9
5.2- Crescimento celular: efeitos da desnutrição.....	12
5.3- Metabolismo protéico no músculo esquelético.....	15
5.3.1- Síntese protéica.....	15
5.3.2- Degradação protéica.....	17
5.4- Recuperação nutricional: efeitos do exercício.....	18
5.5- <i>Spirulina</i> como fonte protéica alimentar.....	20
6-MATERIAL E MÉTODOS	23
6.1- Animais.....	23
6.2- Dietas.....	23
6.3- Modelo de restrição protéica alimentar para induzir quadro de desnutrição.....	26
6.4- Delineamento e grupos experimentais.....	27
6.5- Adaptação ao meio líquido.....	28
6.6- Teste do lactato mínimo (TLM).....	28
6.7- TLM adaptado às condições do rato.....	29
6.8- Avaliações realizadas antes da morte dos animais.....	30
6.9- Morte dos animais e coleta do material biológico.....	30
6.10- Bioquímica sanguínea.....	30
6.11- Crescimento celular no músculo.....	31
6.12- Síntese de proteína muscular.....	31
6.13- Degradação de proteína muscular.....	32
6.14- Expressão da miosina no músculo esquelético (<i>Western Blotting</i>).....	32
6.15- Fosfatase alcalina muscular.....	33
6.16- Glicogênio muscular e hepático.....	33
6.17- Lipídios no fígado.....	34
6.18- Composição química da carcaça.....	34
6.19- Análise estatística.....	34

7- RESULTADOS	35
CAPÍTULO 1:	
VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R. Desnutrição: metabolismo protéico muscular e recuperação nutricional associada ao exercício Revista Motriz (Unesp Rio Claro) . 14(1): 74-84, 2008 (Publicado / Anexo).....	37
CAPÍTULO 2:	
VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R. Spirulina melhora o metabolismo de proteína da musculatura esquelética de ratos em processo de crescimento (Artigo Original). European Journal of Nutrition . 47: 393-400, 2008.....	54
(Publicado / Anexo)	
CAPÍTULO 3:	
VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determinação da transição metabólica através do teste do lactato mínimo em ratos desnutridos. Revista da Educação Física (UEM) . 18(1): 33-39, 2008 (Publicado / Anexo).....	72
CAPÍTULO 4:	
VOLTARELLI, F.A; ARAÚJO, M.B; RIBEIRO, C; MOTA, C.S.A; MELLO, M.A.R. Spirulina como fonte de proteína na dieta para ratos em recuperação da desnutrição: efeitos sobre o metabolismo protéico muscular e crescimento corporal. Journal of Ethnopharmacology , 2008 (Submetido / Anexo).....	85
8- COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES GERAIS	106
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	113
10- ANEXOS (Cópias de Artigos Publicados e Submetidos).....	124
10.1- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R. Metabolismo protéico muscular, spirulina e recuperação nutricional associada ao exercício Revista Motriz (Unesp Rio Claro) . 14(1): 74-84, 2008	
10.2- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R. <i>Spirulina enhanced the skeletal muscle protein in growing rats</i> . European Journal of Nutrition . 47: 393-400, 2008	
10.3- VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determinação da transição metabólica através do teste do lactato mínimo em ratos desnutridos. Revista da Educação Física (UEM) . 18(1): 33-39, 2007.	

10.4- VOLTARELLI, F.A; ARAÚJO, M.B; RIBEIRO, C; MOTA, C.S.A; MELLO, M.A.R. *Spirulina as the dietary protein source for rats recovering from malnutrition: effects on muscle protein and body growth.* **Journal of Ethnopharmacology**, 2008. (Submetido)

10.5- Período de Estágio no Exterior

Faculdade de Desporto – Universidade do Porto - Portugal

Artigos publicados..... 147

10.5.1- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; DUARTE, J.A.R.

Apoptose e exercício físico: efeitos sobre o músculo esquelético.

Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano.

12 (1): 13-19, 2008..... 147

10.5.2- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; DUARTE, J.A.R.

Atrofia Muscular Esquelética e Modelos Experimentais: Apoptose e

Alterações Histológicas, Bioquímicas e Metabólicas. **Revista da**

Educação Física (UEM). 18 (1): 85-95, 2007..... 148

10.5.3-VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; DUARTE, J.A.R.

Apoptose e sarcopenia do músculo esquelético no envelhecimento.

Revista Motriz (Rio Claro). 13 (2): 137-144, 2007..... 149

1- RESUMO DA TESE

A desnutrição protéica é, ainda, hoje, grave problema médico-social nos países em desenvolvimento. Assim, é de grande interesse o desenvolvimento de procedimentos mais efetivos no seu tratamento. Isso inclui o emprego do exercício físico bem como de novas fontes de proteína na alimentação. O presente estudo visou avaliar os efeitos da *spirulina* como fonte protéica, associada ou não ao exercício físico, sobre o crescimento e o metabolismo protéico muscular de ratos em recuperação da desnutrição protéica. Foram utilizados ratos Wistar, jovens (30 dias), separados nos seguintes grupos, de acordo com a fonte e a quantidade de proteína na dieta: I- Caseína 17% dos 30 aos 150 dias de idade; II- *Spirulina* 17% dos 30 aos 150 dias de idade; III- Caseína 6% dos 30 aos 150 dias de idade; IV- Caseína 6% dos 30 aos 90 dias e *Spirulina* 17% dos 91 aos 150 dias de idade; V- Caseína 6% dos 30 aos 90 dias e Caseína 17% dos 91 aos 150 dias de idade. Aos 91 dias, metade dos animais de cada grupo foi submetida ao treinamento físico de natação, 1 hora/dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas, com sobrecarga equivalente à transição metabólica aeróbio/anaeróbio determinada pelo teste do lactato mínimo. No músculo sóleo foram determinados peso e teores de proteína total e de DNA para inferir sobre o crescimento. Como índices do metabolismo protéico muscular, foram avaliadas as taxas de síntese (incorporação de ¹⁴C fenilalanina) e degradação (liberação de tirosina) de proteínas bem como a expressão da proteína miosina (*western blotting*). A *spirulina* provou ser uma fonte protéica adequada para animais submetidos ou não à desnutrição protéica. Tal qualidade pôde ser comprovada

pela manutenção do comprimento e do peso corporais de animais jovens alimentados com a dieta balanceada contendo *spirulina*. No que diz respeito às análises do metabolismo protéico muscular, as taxas de síntese protéica bem como a expressão da miosina foram aumentadas, em ratos jovens, pela ingestão da dieta balanceada contendo *spirulina*, se comparados a ratos mantidos com a dieta balanceada contendo caseína. Em relação aos ratos submetidos à desnutrição protéica, constatou-se que as taxas de degradação protéica muscular, aumentadas pela desnutrição, bem como as taxas de síntese protéica muscular e decréscimo corporal reduzidas pela desnutrição, foram igualmente recuperadas com a ingestão de dietas balanceadas contendo *spirulina* ou caseína. Além disso, foi possível determinar a transição metabólica aeróbia/anaeróbia de ratos desnutridos, através do teste do lactato mínimo durante exercício de natação. Os animais desnutridos apresentaram concentração de lactato sanguíneo equivalente à transição metabólica mais baixa em relação aos animais controle para uma mesma carga de exercício, indicando que a restrição protéica altera a cinética de lactato sanguíneo durante a natação em ratos. Em conjunto, os resultados da presente Tese de Doutorado indicam, em ratos previamente submetidos à restrição protéica e posteriormente alimentados com dietas balanceadas com caseína e/ou *spirulina*, que ambas as dietas foram igualmente eficientes em reverter as alterações no crescimento corporal e no metabolismo protéico muscular induzidas pela restrição protéica. Ainda, mais estudos são necessários afim de se identificar as causas reais da diminuição da concentração de lactato sanguíneo, durante a realização do exercício físico observada em animais desnutridos.

Palavras-chaves: Músculo esquelético; *Spirulina*; Desnutrição protéica; Metabolismo protéico; Lactato sanguíneo; Ratos.

2- THESIS ABSTRACT

As we enter the 21st century and the new millennium, malnutrition remains the single most important factor impairing health and productivity of large human populations, mainly in the developing countries. For this reason, the exploration of alternative alimentary protein sources became a matter of generalized interest and may be, or not, associated to physical exercise. The present study verified the effects of the blue green alga *spirulina* as the dietary source of protein, associated or not to physical exercise, on growing and protein metabolism in skeletal muscle of young rats recovering from malnutrition. Young male wistar rats were separated into groups, according to diet protocol: Casein 6% from 30 to 150 days old; Spirulina 17% from 30 to 150 days; Casein 17% from 30 to 150 days; Casein 6% from 30 to 90 days and Spirulina 17% from 91 to 150 days and Casein 6% from 30 to 90 days and Casein 17% from 91 to 150 days. At 91 days, 50% of the animals of each group was submitted to swimming physical training, 1 hour/day, 5 days/week, during 8 weeks, supporting overload equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition determined by lactate minimum test. *Spirulina* proved to be an adequate protein source for animals submitted or not to protein malnutrition. This quality could be demonstrated by the maintenance of body length and weight of young animals fed the balanced diet containing *spirulina*. Considering the analysis of the muscle protein metabolism, the rates of protein synthesis and the expression of myosin were increased in young rats fed the balanced diet

containing spirulina, when compared with the rats fed the balanced diet containing casein. For rats subjected to protein malnutrition, it was found that the rates of muscle protein degradation, increased by protein malnutrition, as well as the rates of muscle protein synthesis and body growth, reduced by protein malnutrition, were recovered with the intake of the balanced diets containing *spirulina* or casein. Moreover, it was possible to determine the aerobic / anaerobic metabolic transition of protein malnourished rats during swimming exercise, through the minimum lactate test. The malnourished animals had lower blood lactate concentration at the metabolic transition in relation to the control animals, for the same load of exercise, indicating that protein restriction alters blood lactate kinetics during swimming exercise in rats. Together, the results of this thesis show that, in rats previously submitted protein restriction and then fed balanced diets with casein or *spirulina*, both diets were equally effective in reversing the changes in body growth and in muscle protein metabolism induced protein restriction. Still, more studies are necessary in order to identify the actual causes of the decrease in the blood lactate concentration during swimming exercise observed in protein malnourished animals.

Key words: Skeletal muscle; *Spirulina*; Protein malnutrition; Protein metabolism; Blood lactate; Rats.

3- INTRODUÇÃO GERAL

Os efeitos da fome sobre populações têm sido observados desde épocas remotas e descritos através dos tempos. Contudo, pesquisas realizadas utilizando métodos científicos para avaliação da desnutrição, sua prevalência, natureza e abrangência de seus efeitos e integração com outros fenômenos, só tiveram início em épocas recentes.

Em 1928, a antiga liga das nações, sob o patrocínio de sua organização de higiene, procedeu a inquéritos em diferentes países. Foram, então, divulgados relatórios sobre as condições alimentares no mundo, demonstrando que mais de 2/3 da humanidade viviam em permanente estado de fome (CASTRO, 1965).

Mais recentemente, baseado em pesquisas nutricionais realizadas em todos os continentes, a Food and Agriculture Organization of the United Nations (2001) relatou que, embora em termos percentuais, tenha havido decréscimo na incidência de desnutrição entre 1990 e 1999, em números absolutos 623,7 milhões de pessoas nesses continentes ainda são acometidas por essa carência nutricional.

No Brasil, em 1996, foram efetuados inquéritos sobre o estado nutricional da população de menores de 5 anos, em áreas urbanas e rurais em diferentes regiões (MONTEIRO, 2003). Em áreas urbanas da região Centro-Sul (inclui as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul), por exemplo, a prevalência da desnutrição situou-se

próximo a 4,6%, enquanto que em áreas urbanas das regiões Norte e Nordeste chegou aos 16,6 e 13,0%, respectivamente.

Há várias décadas a desnutrição protéica vem preocupando autoridades ligadas aos setores de saúde pública, principalmente a Organização Mundial de Saúde (OMS), cujos técnicos têm debatido a descoberta e o emprego de novas fontes protéicas bem como as normas a serem seguidas para seu uso na alimentação humana (MOURA, 1981).

Além da agricultura e da pecuária convencionais, outras fontes protéicas têm sido examinadas. Nesse sentido, microorganismos têm recebido atenção especial como fonte alternativa de proteína na dieta. O termo *biomassa* ou *single cell protein* (*scp*) foi proposto por Tannembaum (1975) como um termo genérico para indicar fontes protéicas brutas ou refinadas, originárias de microorganismos.

Existem, pelo menos, duas razões para se pensar a respeito do papel da *biomassa* na alimentação humana: a velocidade de reprodução dos microorganismos e o grau de controle que pode ser exercido sobre suas condições de crescimento (MOURA, 1981). Entre vários organismos que vêm sendo estudados, a alga verde-azulada *spirulina* é considerada um microorganismo promissor para essa finalidade

Araújo et al. (2003) realizaram estudo utilizando a biomassa *spirulina*, proveniente de três países distintos (México, China e Cuba), administrada a ratos adultos durante 28 dias. Nesse experimento, foram formuladas rações contendo 5% e 10% de cada biomassa e o efeito das mesmas foi verificado através de dois parâmetros: crescimento corporal e consumo de alimento. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a ingestão de *spirulina* pelos ratos, aos níveis de 5% e 10% da dieta, não

alterou peso corporal e consumo alimentar em comparação com animais que receberam dieta controle. Estes resultados foram independentes da origem das biomassas utilizadas e sugerem que a *spirulina* pode ser utilizada como fonte alimentar sem que haja comprometimento ao organismo.

A desnutrição protéica implica em comprometimento funcional de diversos sistemas e órgãos de seus portadores, entre eles, a musculatura esquelética (WATERLOW; ALLAYNE, 1974; TORUN; CHEW, 1994). Algumas alterações são totalmente revertidas com a recuperação nutricional, enquanto outras, não.

Por outro lado, sabe-se que a prática regular de atividade física exerce efeitos benéficos para a saúde, tais como aumento da capacidade oxidativa e do crescimento muscular, melhora das condições cardiorrespiratórias e facilitação da mineralização óssea, entre outros (BURNS et al., 2005). Assim sendo, no presente estudo, visa-se avaliar os efeitos da *spirulina* como fonte protéica, associada ou não ao exercício, na recuperação de ratos submetidos à desnutrição protéica.

4 – OBJETIVOS

4.1- Objetivo geral

A presente Tese foi delineada para avaliar os efeitos da *spirulina* como fonte protéica, associada ou não ao exercício físico, sobre o crescimento e metabolismo protéico do músculo estriado esquelético de ratos durante a recuperação de desnutrição protéica.

4.2- Objetivos específicos

Os objetivos específicos da presente Tese foram divididos em três (3) pontos principais, sendo:

- a) Avaliação dos índices do crescimento muscular e do metabolismo protéico em ratos jovens mantidos com nível adequado de proteína na dieta proveniente da *spirulina*;
- b) Verificação da concentração de lactato sanguíneo, referente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia, durante o teste do lactato mínimo em ratos desnutridos;
- c) Análise dos efeitos das dietas à base de caseína e *spirulina* na recuperação nutricional de ratos previamente submetidos à restrição protéica alimentar.

5 – REVISÃO DA LITERATURA

5.1- Desnutrição protéico-calórica: características gerais

A desnutrição, ou mais corretamente, as deficiências nutricionais – porque são várias as modalidades de desnutrição – são doenças que decorrem do aporte alimentar insuficiente em energia e nutrientes ou, ainda, com alguma frequência, do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos, geralmente motivado pela presença de doenças, em particular infecciosas (MONTEIRO, 2003).

As conseqüências da desnutrição para o organismo são variadas, entretanto desde as formas leves às mais severas é constante o comprometimento do crescimento. Por essa razão, são utilizados indicadores antropométricos com a finalidade de diagnosticar a desnutrição infantil. O parâmetro mais usado é a adequação percentual do peso corporal do indivíduo em relação à idade. A classificação mais empregada para avaliar o estado nutricional de crianças de 1 a 4 anos é a proposta por Gomes (1946) e prevê três graus para a desnutrição, conforme o déficit ponderal seja de 10 a 24% (primeiro grau ou leve), de 25 a 40% (segundo grau ou moderada) ou maior de 40% (terceiro grau ou grave). *Marasmo e Kwashiorkor* são duas síndromes que correspondem a manifestações extremas da desnutrição de terceiro grau (TORUN; CHEW, 1994).

O *Kwashiorkor* manifesta-se com maior frequência nos três primeiros anos de vida, especialmente no segundo. 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).

O *Marasmo* instala-se nos primeiros anos, preferencialmente no decorrer do primeiro ano. Tem sido freqüentemente observado em crianças com 6 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 atrofia muscular e redução de gordura subcutânea (TORUN; CHEW, 1994).

Ainda existe considerável discussão sobre as diferenças na etiologia dessas duas síndromes reconhecidas da desnutrição. Embora elas sejam vistas como doenças que marcam os pontos finais do espectro das doenças também conhecidas pelo termo desnutrição protéico-calórica e que foi usado pela primeira vez por Jelliffe em 1966, alguns autores sugeriram que ambas as formas de desnutrição poderiam resultar de um mesmo tipo e grau de privação dietética (SAWAYA, 1985). Outros acreditam que o *kwashiorkor* é basicamente uma deficiência protéica e o marasmo uma deficiência energética. Parece que as diferenças na etiologia podem ocorrer de acordo com as áreas geográficas, tipo de alimento, idade, ausência ou presença de algumas infecções, diarreia etc.

Ambas as doenças ocorrem mais freqüentemente entre crianças e bebês vivendo em zonas pobres dos países em desenvolvimento. Até a década de 1960, o *kwashiorkor* foi considerado a forma de desnutrição predominante, talvez por causa das suas características patológicas e metabólicas exóticas, muito diferentes das doenças encontradas na Europa. Hoje, se sabe, porém, que o marasmo é mais freqüente (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003).

No entanto, apesar do ritmo acelerado com que se processa a redução da desnutrição no Brasil, ainda não existe uma região onde se tenha completado a correção do déficit de estatura de crianças menores de cinco anos. O objetivo de se atingir os valores da curva de referência de crescimento (tabela do *National Center of Health Statistics* – Centro Nacional de Estatística da Saúde - universalmente recomendada) está relativamente próximo de ser alcançado nas populações urbanas do Sudeste, Sul e Centro- Oeste, mas ainda acha-se bem distante no Norte e Nordeste (MONTEIRO, 2003). Nessas duas regiões, há a prevalência da carência protéica (de forma endêmica), o que pode aumentar a incidência e instalação do *Kwashiorkor* nessa população, sobrepondo-se à instalação do marasmo (BATISTA FILHO & RISSIN, 2003).

A desnutrição do tipo *Kwashiorkor* pode ser caracterizada pela deficiência de proteína na dieta, além de vitaminas e sais minerais, onde a alimentação ingerida na forma de carboidrato é normal (arroz, milho e mandioca, por exemplo; alimentos de baixo custo), não ocorrendo o mesmo com a ingestão de fontes alimentares ricas em proteínas (como por exemplo, a carne bovina e/ou de aves; alimento de custo elevado). Os danos do *kwashiorkor* para o organismo são principalmente sobre o sistema imunológico, a ponto de qualquer infecção ser mortal para o indivíduo acometido e, ainda, esses danos são, na maioria dos casos, irreversíveis nesse tipo de desnutrição, tornando-a assim uma síndrome com menor grau de adaptação em relação ao marasmo (MENDONÇA, 2003).

A desnutrição durante a fase intra-uterina é assunto que tem sido abordado com destaque a partir da década de 1970. Entretanto, já em 1928, Capper distinguiu prematuros de recém-nascidos pequenos de gestação a termo e, na ocasião, observou-se que os últimos evoluíram para escolares atrasados, potencialmente neuróticos ou psicóticos. Antov (1947) demonstrou que, durante o cerco de Leningrado,

na Segunda Guerra Mundial, ocorreu diminuição de cerca de 500 a 600g no peso das crianças ao nascer. Os estudos de Smith (1947), a respeito da desnutrição materna ocorrida na Holanda em 1945, sobre o desenvolvimento fetal, acusaram diminuição de 240g no peso ao nascer. Após essas constatações iniciais, vários foram os trabalhos clínicos e experimentais desenvolvidos nessa área.

Estudos efetuados em animais de laboratório, como ratos, cobaias e macacos, mostraram que a deficiência de proteínas (HINZ et al., 1976; KHORS et al., 1980; LATORRACA et al., 1998; GALDINO et al., 2000) ou a restrição alimentar (ANDERSON et al., 1980; FERRARI et al., 1992) pré-natais causam retardo no crescimento fetal. Em animais, também, a desnutrição protéica crônica, imposta a várias gerações, resultou em retardo marcante do peso ao nascer, tamanho de órgãos, maturação sexual, comportamento e padrões de aprendizagem (STEWART et al., 1975).

5.2- Crescimento celular: efeitos da desnutrição

O crescimento de qualquer órgão pode ser causado por aumento no número de células (hiperplasia), por aumento no tamanho das células já existentes (hipertrofia) ou por ambos os processos simultaneamente. O número total de células pode ser medido, com algumas exceções, determinando-se o conteúdo total de DNA do órgão e dividindo-se por uma constante que representa o conteúdo de DNA por núcleo diplóide na espécie em estudo (WINICK et al., 1972).

Determinado o número de células, o peso médio por célula, o conteúdo protéico por célula, o conteúdo de RNA por célula, entre outros, podem ser avaliados através da determinação da quantidade total de cada um desses elementos e dividindo-se pelo número de células. O resultado pode ser expresso como razões peso/DNA; proteína/DNA; RNA/DNA, etc (WINICK et al., 1972).

O aumento do conteúdo de DNA representa um tipo de crescimento, ou seja, aumento do número de células; enquanto que o aumento das razões peso/DNA, proteína /DNA e RNA/DNA representam outro aspecto do crescimento, isto é, o aumento da massa tecidual sem aumento no número de células (WINICK et al., 1972).

Parece claro, à vista do exposto, que numa agressão nutricional na fase de hiperplasia, por interferir com o número de células, poderá levar à lesão irreversível. Ocorrendo insulto na fase de hipertrofia, o efeito poderia ser reversível. Portanto, os efeitos da agressão, em caso de desnutrição, dependem fundamentalmente da fase de desenvolvimento orgânico em que o organismo se encontra. Desse modo, quando a desnutrição se impõe desde o período pré-natal, suas conseqüências tendem a ser mais graves.

Com a finalidade de estudar os efeitos da desnutrição sobre esses padrões de crescimento, Winick & Noble (1996) utilizaram 3 grupos de ratos. Um grupo sob restrição de calorias de zero a 20 dias de idade (época em que todos os órgãos, no caso, estão crescendo por divisão celular exclusivamente); o segundo grupo sob restrição dos 21 aos 42 dias (época em que o cérebro e os pulmões não estão crescendo mais por divisão celular) e o terceiro, dos 64 aos 86 dias (quando todos os órgãos estão crescendo por hiperplasia celular). Após o período de restrição, todos os animais foram realimentados.

Os resultados indicaram que restrição precoce (grupo 1) interferiu com a divisão celular e os animais apresentaram menor número de células em todos os órgãos estudados, mesmo após a realimentação. Desnutrição tardia (grupo 3) resultou e, decréscimo da razão proteína/DNA (tamanho celular), com recuperação durante a realimentação. Nos animais desnutridos de 21 a 42 dias (grupo 2), todos os órgão apresentaram redução de proteínas e peso, mas o cérebro e os pulmões apresentaram

conteúdo norma de DNA enquanto que os outros órgãos tiveram conteúdo reduzido de DNA. Somente o cérebro e os pulmões recuperaram-se durante a realimentação. Estes dados suportam a hipótese de que a interferência com a divisão celular resulta em efeitos permanentes no organismo.

Albanes et al. (1990) observaram que restrição calórica (40%) imposta por três semanas, iniciada ao desmame, resultou em animais portadores de cólon mais leves, com menor número de células (menor quantidade de DNA total) e com redução da síntese de DNA (captação de ³H timidina) quando comparados a animais bem nutridos. Galdino (1996) constatou redução significativa no teor de DNA (número de células) no coração dos fetos no 19º dia de gestação.

Os efeitos da restrição energética prolongada e subsequente realimentação sobre o músculo esquelético foram estudados em ratos obesos da linhagem Zucker, os quais mostraram marcante perda da massa corporal (64%), com conseqüente perda tecidual e redução no diâmetro das fibras no músculo plantar (BEMBEN et al., 1997). Por outro lado, Bembem e colaboradores (1997) demonstraram que a realimentação aumenta o diâmetro das fibras musculares, o qual se aproxima dos valores normais de ratos bem nutridos. Similarmente, Glore & Layman (1987) mostraram que a recuperação nutricional promove aumento na massa muscular de animais previamente submetidos à desnutrição protéico-calórica.

NASCIMENTO et al. (1990) observaram redução de aproximadamente 50% no peso de ratos desnutridos quando comparados com normais e um importante decréscimo no diâmetro das fibras musculares desses animais. Recentemente, em outro estudo, Ventrucci et al. (2004) observaram uma diminuição de cerca de 78% no peso do tecido muscular de ratos submetidos à desnutrição protéico calórica.

A perda de tecido muscular na desnutrição protéica pode ser considerada um mecanismo homeostático. A desnutrição protéica promove uma redistribuição funcional das proteínas musculares para disponibilizar nitrogênio necessário para a síntese de proteínas teciduais, formação de células vermelhas e exercer funções imunes. A inter-relação de gordura, músculo e fígado envolve o catabolismo das proteínas musculares e liberação de precursores da neoglicogênese que serão utilizados pelo fígado. Durante esse processo, corpos cetônicos são sintetizados no fígado a partir da gordura e usados como combustível pelo cérebro e outros órgãos ao invés de glicose (BLACKBURN, 2001).

5.3- Metabolismo protéico no músculo esquelético

5.3.1- Síntese Protéica

Uma das principais vias de sinalização de síntese protéica muscular, que é ativada por sinais induzidos por insulina, aminoácidos e exercício de resistência é denominada *Phosphatidylinositol 3-kinase- mammalian target of rapamycin* (PI3K-mTOR) (BOLSTER et al., 2004).

Os mecanismos envolvidos na estimulação da síntese protéica muscular que ocorre em resposta à ativação da via de sinalização PI3K-mTOR podem ser separados em duas categorias temporais: a) mudanças imediatas, isto é, aquelas que ocorrem em menos de uma hora e que podem ser traçadas para aumentar as taxas de tradução de RNAm mediadas por ativação dos fatores de iniciação de tradução e b) mudanças a longo prazo, ou seja, aquelas que ocorrem após várias horas e que são resultado do aumento do número de ribossomos designados para a tradução de RNAm. Além disso, a sinalização de mTOR promove transcrição do DNA ribossomal. Juntos, o aumento da tradução de RNAm codificando proteínas ribossomais e o aumento da

transcrição de DNA ribossomal promovem a biogênese de ribossomos. Aumento no conteúdo celular de ribossomos é um mecanismo para elevar a capacidade crônica da célula para sintetizar proteína (FINGAR et al., 2002).

Em estudo realizado por Bodini et al. (2001) relacionando síntese protéica no músculo esquelético e exercício resistido, observou-se que os dados suportam a idéia de que outro componente da cascata quinase, a sinalização de Akt/mTOR, seja ativada e promova a regulação da translação de RNAm, causando assim, hipertrofia da musculatura esquelética.

O controle central de mTOR como mediador da resposta hipertrófica sob condições de exercício físico de resistência tem sido verificado através de tratamento *in vivo* com rapamycin (um inibidor específico de mTOR), o qual bloqueia quase que completamente a hipertrofia muscular (REYNOLDS et al., 2002), mostrando assim, a importância da via mTOR na síntese protéica muscular quando da realização de exercício físico.

Contudo, cada uma dessas proteínas pertencentes à via de sinalização PI3K-mTOR (incluindo a proteína Akt) é indispensável para mediar o crescimento da musculatura esquelética e, embora sejam propostas proteínas distintas como potenciais marcadores de hipertrofia muscular, uma resposta coordenada de vias de transdução de múltiplos sinais é essencial para todo o processo (BOLSTER et al., 2004).

5.3.2- Degradação Protéica

Nos últimos anos, os principais mecanismos de degradação protéica ou proteólise foram elucidados. A proteólise muscular ocorre através de vias lisossomal e não lisossomal. A via não lisossomal é controlada pelo sistema ubiquitina-proteossomo, principal responsável na quebra de proteínas miofibrilares e intracelulares de células eucarióticas (KEE et al., 2002; TAILLANDIER et al., 2004). A via da ubiquitina é um processo complexo, ativada no músculo durante o catabolismo severo (WRAY et al., 2002). Este processo envolve múltiplos estágios que são proteossomo-dependentes. Incluem a ubiquitinização da proteína da família enzimática ubiquitina E1, E2 e E3 e o proteossomo 26S (ATTAIX, 2001), que dependem de energia fornecida pelo ATP. Além disso, o proteossomo 26S é um complexo proteolítico que consiste de uma partícula central, o 20S, e subunidade proteossomo adicionada por 2 complexos reguladores, o 19S e o 11S, ambos ligados ao terminal da subunidade 20S (GLICKMAN; CHIECHANOVER, 2002).

O exercício excêntrico (momento do processo de contração muscular onde as fibras musculares alongam-se após um encurtamento das mesmas) resulta em lesão do músculo esquelético e estimula a proteólise muscular. De acordo com observações feitas em músculos sob condições de perda de massa muscular (i.e. câncer, trauma), o exercício excêntrico aplicado em sujeitos humanos (ação excêntrico-isocinética do bíceps braquial com a mão não dominante ou *leg press* com extensão do joelho) resultou em aumento dos níveis de ubiquitina-proteossomo, detectado através de biópsia muscular (THOMPSON; SCORDILIS, 1994; STUPKA et al., 2001). Corroborando tais resultados, as atividades da enzima proteossoma elevaram-se após 14 dias de exercício excêntrico no músculo vasto-lateral de voluntários saudáveis, também determinado através de biópsia muscular.

Por outro lado, o exercício aeróbio é conhecido por ter efeitos hipertróficos sobre a musculatura esquelética. Kee et al. (2002) reportaram que em músculos incubados, retirados de ratos 24 horas após 5 dias consecutivos de exercício progressivo em esteira rolante, a proteólise é consideravelmente reduzida quando comparada com a de animais não exercitados. Este fenômeno está associado à redução da atividade da quimotripsina do proteossoma e das taxas de ubiquitina-proteossoma dependente da hidrólise de caseína nos músculos extraídos de ratos exercitados comparados com não exercitados. Em outro estudo, Willoughby et al. (2000) observaram, em pacientes com lesão na medula espinhal (caracterizados por apresentarem catabolismo) submetidos a 12 semanas de exercício, de modo passivo, realizado em bicicleta ergométrica, que houve decréscimo da expressão de ubiquitina, da enzima E2 e da subunidade 20S proteossoma. Estes resultados sugerem que a supressão da proteólise através da via ubiquitina-proteossoma, após exercício de *endurance*, pode contribuir para o ganho protéico, de maneira aguda ou crônica, também sob outras condições deletérias ao organismo, como por exemplo, na desnutrição protéico-calórica.

5.4- Recuperação nutricional: efeitos do exercício

Sabe-se que a prática regular de atividade física exerce efeitos benéficos para a saúde, tais como aumento da capacidade oxidativa e do crescimento muscular, melhora das condições cardiorrespiratórias e facilitação da mineralização óssea, entre outros (POWERS & HOWLEY, 2000). O exercício pode ser, também, benéfico na recuperação nutricional. Ao serem comparados os ritmos do crescimento de crianças entre dois e quatro anos de idade, enquanto se recuperavam de desnutrição em hospitais, verificou-se que as crianças ativas, que participavam de jogos, envolvendo gasto

energético moderado, apresentavam não só massa magra como também tiveram maior crescimento linear do que quando seguiam o nível de atividade física de rotina dos hospitais (jogos sedentários) (TORUN & VITERI, 1994).

Em animais de laboratório, os efeitos do exercício sobre o crescimento corporal são dependentes das propriedades mecânicas do exercício e da espécie de animais utilizados (BORER, 1979). Os resultados referentes a estudos realizados em modelos animais de má nutrição são conflitantes. Alguns apontam efeitos positivos do exercício sobre o crescimento e o desenvolvimento (SAKAMOTO & GRUNEWALD, 1987; GALDINO et al., 2000), enquanto outros trabalhos não encontram qualquer efeito (ROCHA et al., 1997; ZANELATTO et al., 1992). Nesses estudos foram empregadas diferentes espécies de animais, como camundongos (ZANELATTO et al., 1992) e ratos (BARBIRAK et al., 1974; ROCHA et al., 1997; GALDINO et al., 2000), diferentes procedimentos para provocar desnutrição, como jejum intermitente (SAKAMOTO & GRUNEWALD, 1987), jejum prolongado (BARBIRAK et al., 1974) e restrição de ingestão protéica (CREWS, 1969; ZANELATTO et al., 1992; ROCHA et al., 1997; GALDINO et al., 2000) e, ainda, diferentes protocolos de atividades físicas, como natação livre (ZANELATTO et al., 1992), natação com sobrecargas de 5% do peso corporal (ROCHA et al., 1997; GALDINO et al., 2000), o que torna difícil a comparação dos resultados.

Existem muitas evidências epidemiológicas de enfermidades crônicas degenerativas ligadas à desnutrição e à concomitante capacidade de proteção fornecida não só por uma alimentação adequada, mas também por hábitos saudáveis e atividade física moderada e rotineira.

Bass et al. (2005), em estudo abordando revisão da literatura sobre desnutrição protéico-calórica (DPC), reportaram que o exercício físico exerce potencial

efeito no aumento da força-pico da musculatura esquelética e atuação da mesma sobre o tecido ósseo, o que leva a um aumento proporcional da mineralização e densidade óssea em crianças acometidas pela DPC.

Duran et al. (2005) verificaram, em ratos submetidos à desnutrição protéica pré-natal, que o sistema de atividade neuro-locomotor dos mesmos foi afetado negativamente se comparados a animais controles. Essa ocorrência resultou em comprometimentos motores graves quando esses animais atingiram a idade adulta.

Tamaki et al. (2004) realizaram estudo com ratos acometidos pela desnutrição protéica e submetidos ao treinamento físico de corrida em esteira rolante por 3 semanas. Esses autores verificaram inibição da osteoporose nesses animais (comum nesse tipo de desnutrição), se comparados com ratos também desnutridos mas mantidos sedentários, pelo não aumento dos níveis da enzima fosfatase alcalina (marcadora bioquímica da incidência de osteoporose).

Mais estudos são necessários afim de esclarecer melhor os efeitos do exercício físico sobre a recuperação nutricional sob o ponto de vista do tipo de indução da desnutrição e tipo de exercício empregado, onde nesse último tornam-se importantes ergômetro e intensidade utilizados para esse fim.

5.5 - *Spirulina* como fonte protéica alimentar

Spirulina é uma alga verde-azulada de forma helicoidal, com comprimento de 0,2-0,5mm (BELAY et al., 1993). O mérito especial dessa alga como fonte alimentícia é que a mesma contém 65 a 70% de proteína, com base no peso seco, o que é superior a qualquer outra fonte natural de alimento e contém os oito aminoácidos essenciais ao homem (NAKAYA et al., 1998). A alga cresce, normalmente, em águas de lagos naturalmente alcalino, localizados em zonas áridas. Embora a água alcalina desses lagos não possa ser utilizada para irrigação, pode ser

aproveitada para o cultivo de *spirulina* e, uma vez que essa alga tem uma taxa de reprodução rápida, dividindo-se três vezes ao dia, uma área devotada totalmente ao crescimento de *spirulina* pode produzir 125 vezes mais proteína que área de mesma dimensão devotada ao cultivo de milho; 70 vezes mais do que se voltada a criação de peixes ou 600 vezes mais se voltada para criação de gado (FURST, 1978).

De acordo com avaliações prévias efetuadas com seres humanos, a *spirulina* parece ser boa fonte protéica para a alimentação. Tem boa aceitação e não apresenta efeitos tóxicos aparentes, embora tenha digestibilidade um pouco reduzida (KAY, 1991). Em estudos conduzidos com animais de laboratório, especialmente ratos, constatou-se que, também para estes, a *spirulina* apresenta boa aceitação, adequada digestibilidade e ausência de efeitos tóxicos (SALAZAR et al., 1998).

Em estudos efetuados com ratos, verificou-se que a *spirulina* é um bom suplemento durante a gestação (KAPOOR; MEHTA, 1998; SALAZAR et al., 1998) e não parece exercer qualquer efeito deletério sobre marcadores de crescimento das crias (SALAZAR et al., 1998). Além disso, outros trabalhos mostraram que a *spirulina* pode exercer efeitos benéficos no tratamento de algumas formas de câncer (COMBS et al., 1989; NAGASAWA et al., 1989) e da desnutrição (FICA et al., 1984).

Grinstead et al. (2000) observaram que uma dieta suplementada com 2,8 gramas de *spirulina* 3 vezes ao dia ao longo de 4 semanas resultou em significativa redução do peso corporal de porcos obesos. A *spirulina* demonstrou eficácia, também, em atenuar a hipertensão arterial de ratos (IWATA et al., 1990; HERNÁNDEZ et al., 2001).

O Conselho Econômico e Social das Nações Unidas, em plenário realizado no dia 15 de Julho de 2003, nos Estados Unidos, reuniu delegações de vários países com o intuito de estabelecer algumas metas visando intensificar programas de

assistência humanitária. Entre as delegações estava a França, representada por Gilles Grillet (Membro-Chefe da Instituição Inter-Governamental para o uso da Micro-Alga Spirulina no combate à Desnutrição). Grillet, em sua fala, propôs ao Conselho o consumo da *spirulina* como meio de combate à desnutrição severa e a utilização dessa micro-alga como suporte para o desenvolvimento rural, além de defender a criação de centros produtores de *spirulina* para abastecer populações acometidas pela desnutrição.

6 – MATERIAL E MÉTODOS

6.1 – Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, jovens (30 dias de idade, no início do experimento), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu/SP. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) e foram alimentados com dietas semi-purificadas e água *ad libitum* bem como mantidos sob ciclo periódico claro e escuro de 12 horas à temperatura média de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.2 – Dietas

Foram utilizadas dietas isocalóricas semi purificadas: controle (contendo 17% de proteína na forma de caseína, de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition, AIN-G93 (REEVES et al., 1993), *spirulina* (contendo 17% de proteína na forma de *spirulina*) e hipoprotéica (contendo 6% de proteína na forma de caseína (Latorraca et al., 1998). A dieta controle teve a seguinte composição (%): amido de milho = 39,7; dextrina = 13,2; sacarose = 10; óleo de soja = 7; microcelulose = 5, mistura de sais minerais = 3,5; mistura de vitaminas 1,0. A composição detalhada das misturas de sais minerais e de vitaminas acha-se descritas em REEVES et al.(1993). A dieta *spirulina* conteve as mesmas quantidades de carboidratos e lipídios que a dieta controle. Foram feitos ajustes nos conteúdos de sais minerais, vitaminas e de fibras,

levando em conta os teores desses elementos na *spirulina**, para que fossem preservadas as recomendações da AIN-G93 para esses nutrientes. A dieta hipoprotéica conteve mais carboidratos (44,4% de amido de milho, 17,8% de dextrina e 14,9% de sacarose), mas a mesma quantidade de gordura (7%), fibras (5%), mistura de sais minerais (3,5%) e mistura de vitaminas (1,0%) que a dieta controle.

*As tabelas de 1 a 4 resumem algumas características da *spirulina*.

Tabela 1: Composição geral da *spirulina** (%)

Proteínas	55-70
Carboidratos	15-25
Lipídios	03-06
Minerais (cinzas)	07-13
Umidade	03-07
Fibras	08-10

* Conforme informado pelo fornecedor All Chemistry Brasil LTDA.

Tabela 2: Composição de aminoácidos da *spirulina** (mg/g)

Essenciais			
Isoleucina	350	Fenilalanina	280
Leucina	540	Treonina	320
Lisina	290	Triptofano	90
Metionina	140	Valina	400
Não-Essenciais			
Alanina	470	Glicina	320
Arginina	430	Histidina	100
Ácido Aspártico	610	Prolina	270
Cistina	60	Serina	320
Ácido Glutâmico	910	Tirosina	300

* Conforme informado pelo fornecedor All Chemistry Brasil LTDA.

Tabela 3: Composição de vitaminas da *spirulina** (por 100 gramas)

Vitaminas (A23000 IU)			
Vitamina A (Retinol)	200,0 mg	Vitamina B12 (Cianocobalamina)	0,25mg
Vitamina B1 (Tiamina)	4,0 mg	Vitamina E (Tocoferol)	7,0mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	3,5mg	Inositol	100mg
Vitamina B6 (Piridoxina)	0,7mg	Ácido Pantotênico	0,8mg

* Conforme informado pelo fornecedor All Chemistry Brasil LTDA.

Tabela 4: Composição de elementos minerais da *spirulina** (por 100 gramas)

Minerais			
Fosfato	1400,0mg	Cálcio	400,0mg
Fósforo	700,0mg	Magnésio	200mg
Sódio	500,0mg	Ferro	50mg

* Conforme informado pelo fornecedor All Chemistry Brasil LTDA.

6.3 – Modelo de restrição protéica alimentar para induzir quadro de desnutrição.

Um modelo experimental bastante aceito e empregado com frequência por nosso grupo de pesquisa (VENTRUCCI et al., 2004; MELLO et al., 2003; LATORRACA et al., 1998; LATORRACA et al., 1999) e por outros grupos (OZANNE et al., 2004; PETRY et al., 2000; SNOECK et al. 1990) para a análise das alterações endócrino-metabólicas impostas pela desnutrição, consiste na alimentação de roedores, especialmente o rato, com dietas com baixo conteúdo de proteína. Esse modelo tem se mostrado útil no estudo da hipótese do “thrifty phenotype”, que propõe que as associações epidemiológicas entre o retardo no desenvolvimento fetal e na infância e o subsequente desenvolvimento de diabetes do tipo 2, obesidade e síndrome metabólica resultam da desnutrição precoce, que produz alterações permanentes na regulação glicêmica pela insulina (HALES; BARKER, 1992). Associação entre desnutrição na infância e obesidade e co-morbidades na idade adulta é fenômeno crescente nos países em desenvolvimento, inclusive o Brasil, que passam pela chamada “transição nutricional” (POPKINS, 2001; MONTEIRO et al., 1995). Dessa forma, optou-se pelo modelo da restrição protéica alimentar para induzir quadro de desnutrição no presente estudo.

6.4 – Delineamento e grupos experimentais

Os animais foram separados em grupos de acordo com a dieta recebida e com a realização ou não do treinamento físico de natação:

- I- Caseína 17%: ratos alimentados com a dieta contendo 17% de proteína na forma de caseína dos 30 aos 150 dias de idade;
- II- *Spirulina* 17%: ratos alimentados com a dieta contendo 17% de proteína na forma de *spirulina* dos 30 aos 150 dias de idade;
- III- Caseína 6%: ratos alimentados com a dieta contendo 6% de proteína na forma de caseína dos 30 aos 150 dias de idade;
- IV- Caseína 6% / *Spirulina* 17%: ratos alimentados com a dieta contendo 6% de proteína na forma de caseína dos 30 aos 90 dias de idade e 17% de proteína na forma de *spirulina* dos 91 aos 150 dias de idade;
- V- Caseína 6% / Caseína 17%: ratos alimentados com a dieta contendo 6% de proteína na forma de caseína dos 30 aos 90 dias de idade e 17% de proteína na forma de caseína dos 91 aos 150 dias de idade.

O estudo foi realizado em 3 (quatro) etapas. Na primeira, foram avaliados os índices do crescimento muscular e do metabolismo protéico em ratos mantidos com nível adequado de proteína na dieta (caseína 17% e/ou *spirulina* 17% dos 30 aos 90 dias de idade). Na segunda etapa, foi verificada a concentração de lactato sanguíneo referente à transição metabólica durante o teste do lactato mínimo em ratos alimentados (sedentários) com as dietas caseína 17% e caseína 6%. Na terceira etapa, foram verificados, aos 150 dias de idade, os efeitos das dietas caseína 17% e *spirulina* 17% na

recuperação nutricional de ratos previamente submetidos à restrição protéica alimentar (caseína 6% até os 90 dias de idade).

6.5- Adaptação ao meio líquido

A adaptação consistiu em manter o animal em contato com água rasa (15cm) à temperatura de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 3 semanas, 5 dias por semana por 30 minutos. Nas 2ª e 3ª semanas de adaptação, os mesmos suportaram sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal (VOLTARELLI et al., 2002). O propósito da adaptação foi de reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água.

6.6- Teste do lactato mínimo (TLM)

A determinação da TM pelo TLM, conforme proposto para humanos (TEGTBUR et al., 1993; JONES; DOUST, 1998), consiste em: a) um período breve de exercício de alta intensidade para provocar um aumento de lactato sanguíneo circulante; b) um período breve de recuperação para assegurar a hiperlactacidemia e c) um protocolo de teste de exercício com cargas progressivas, com coleta de sangue para análise de lactato a cada carga. Uma vez que a porção progressiva do TLM começa quando o sujeito apresenta níveis altos de lactato sanguíneo, a mesma produz um perfil de lactato sanguíneo característico, em forma de “U”. A TM foi definida como a intensidade de exercício na qual a “curva em forma de U”, derivada dos valores de lactato sanguíneo obtidos durante o TLM, atinja o nadir. Partindo dos princípios desse protocolo, o teste foi adaptado em nosso laboratório para as condições do rato (VOLTARELLI et al., 2002) e foi empregado no presente estudo, com algumas modificações (VOLTARELLI et al., 2003), para a determinação da TM dos animais.

6.7- TLM adaptado às condições do rato

Inicialmente, os animais foram colocados no tanque cheio d'água suportando sobrecarga equivalente a 15% do peso corporal e exercitaram-se, por natação (exercício intenso), durante 6 minutos (30 segundos de exercício interrompidos por 30 segundos de repouso), com o intuito de elevar a concentração de lactato sanguíneo circulante. Após 9 minutos de repouso, os animais iniciaram exercício de natação com intensidades progressivamente maiores (3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5% do peso corporal), com duração de 5 minutos de exercício em cada carga. Antes do início do teste (repouso) e a cada troca de carga, foram coletadas amostras de sangue a partir da extremidade da cauda do animal (por meio de pequeno corte com tesoura) (25µl) para a determinação do lactato utilizando-se o Método Enzimático (LDH – Lactato Desidrogenase) proposto por Engels & Jones (1978). A curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho, para todos os ratos, determinada no teste, foi obtida por ajuste polinomial de grau 2, com auxílio de um programa de computador (MICROSOFT OFFICE - EXCEL®). Foi procedida, então, a determinação matemática, pela análise da função, obtendo-se o menor valor da concentração de lactato sanguíneo e respectiva carga de trabalho. Esse menor valor indicou a TM dos animais (VOLTARELLI et al., 2004).

6.8- Avaliações realizadas antes da morte dos animais

Durante todo o experimento, os animais foram pesados e medidos (comprimento focinho-ânus) semanalmente e tiveram a quantidade de alimentos ingerida registrada diariamente. A eficiência alimentar foi calculada através da razão ganho de peso durante essa etapa (g) / quantidade de alimento consumido durante a mesma etapa(g), ao passo que a eficiência protéica (PER) foi estimada através da razão ganho de peso(g) / quantidade total de proteína consumida(g).

6.9- Morte dos animais e coleta de material biológico

Ao final, os animais foram mortos por decapitação para a coleta de amostras de sangue, para a determinação dos teores de proteínas totais, albumina, ácidos graxos livres e glicose; fígado, para dosagem de lipídios e glicogênio; músculo sóleo esquerdo, para pesagem e medida de teores de proteína, DNA e atividade da enzima fosfatase alcalina. Foram retiradas fatias do músculo sóleo direito para procedimentos de incubação, visando avaliar as taxas de síntese e degradação de proteínas bem como fatias do gastrocnêmio direito determinar a expressão da proteína miosina.

6.10- Bioquímica sanguínea

Os teores séricos de proteínas totais, albumina, glicose e ácidos graxos livres foram determinados por métodos colorimétricos, conforme descrito por Nogueira et al. (1990).

6.11- Crescimento celular no músculo

Visando inferir quanto ao crescimento no músculo esquelético, foram determinados os teores de DNA, como índice do número de células e as razões proteína/DNA e peso/DNA, como índices de tamanho celular, no músculo sóleo esquerdo (WINICK et al., 1972). Os teores de proteína foram determinados pelo método folin-fenol (LOWRY et al., 1951), enquanto que as taxas de DNA no músculo foram avaliadas pelo método da difenilamina (GILES; MEYERS, 1965).

6.12- Síntese de proteína muscular

Fatias longitudinais (70mg) musculares foram pré-incubadas por 30 minutos em meio RPMI-1640 (com glutamina e sem fenol vermelho e bicarbonato de sódio), suplementado com albumina sérica bovina desengordurada (BSA) [0,1%] e insulina [100u/ml], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio RPMI com a mesma suplementação, contendo ¹⁴C fenilalanina [0,05 uCi/ml] e incubadas por 2 horas. Ao final da incubação, as fatias musculares foram homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) 5% e centrifugadas a 2000rpm por 15 minutos a 4°C. O material TCA-insolúvel foi lavado 3 vezes com TCA 5%. O precipitado resultante foi dissolvido em (SDS) 10% à temperatura ambiente por 30 minutos, para a determinação do conteúdo protéico e da radioatividade incorporada às proteínas musculares. O conteúdo de proteína muscular foi determinado pelo método folin fenol (LOWRY et al., 1951) e a radioatividade incorporada à proteína muscular foi medida com o auxílio de um cintilador. A síntese protéica foi calculada dividindo-se a radioatividade incorporada

pela radioatividade específica da fenilalanina no meio de incubação e expressa como nanomoles de fenilalanina por miligrama de proteína por 2 horas.

6.13- Degradação de proteína muscular

A liberação de tirosina pelo músculo isolado na presença de ciclohexamida foi utilizada como índice da degradação protéica, conforme descrito previamente por Fulks et al. (1975). Este método vale-se do fato de que o aminoácido tirosina não é sintetizado nem degradado pelo músculo esquelético. Fatias longitudinais musculares (70mg) foram pré-incubadas em tampão Krebs-Ringer [NaCl 1,2 mmol/L; KCl 4,8 mmol/L; NaHCO₃ 25 mmol/L; CaCl₂ 2,5 mmol/L; KH₂PO₄ 1,2 mmol/L e MgSO₄ 1,2 mmol/L – pH 7,4] suplementado com glicose [5,5 mmol/L], BSA [1,34%], insulina [5u/ml] e ciclohexamida [5,0 mmol/L], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio de mesma composição e incubada por 2 horas. Ao final da incubação, amostras do meio de incubação foram utilizadas para determinação do teor de tirosina pelo procedimento de Waalkes & Udenfriend (1957).

6.14- Expressão da miosina no músculo esquelético (*Western Blotting*)

Fatias do músculo gastrocnêmio diereito foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (TH) (20 mmol/L Tris, 1mM dithiothreitol, 2 mmol/L ATP e 5 mmol/L MgCl₂) e centrifugadas a 15.000 g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante resultante foi analisado para o conteúdo total de proteína (BRADFORD, 1976).

Amostras de proteína do músculo gastrocnêmio (5µg) foram incorporadas a géis de sódio dodecil sulfato poliacrilamida 12%, transferidas para membrana de celulose 0.45µm (Hybond-C, Amersham, UK) e bloqueadas por meio de

Marvel 5% em tampão de salina PBS, 0,1% tween, pH 7,5. Anticorpo para miosina (Novocastra, New Castle, England) foi utilizado na diluição de 1:250 e o anticorpo secundário, *rabbit anti-mouse*, foi conjugado com peroxidase *horseradish* e foi usado na diluição de 1:1500. Actina foi usada como carga controle, após aplicação de anticorpo *mouse* para actina. A expressão da banda foi revelada usando-se ECL quimioluminescência (Amersham, UK). Os blots foram escaneados por densitometria visando quantificar as diferenças. Para isso, utilizou-se *Gel Pro Analyser software* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

6.15- Fosfatase alcalina muscular

O papel fisiológico da enzima fosfatase alcalina pode estar associado aos sistemas de transporte e atividade celular (CALHAU et al., 1999). Por essa razão, foi dosada a fosfatase alcalina muscular. Fatias do músculo gastrocnêmio foram retiradas, pesadas (100-200mg) e homogeneizadas com sonicador por 40 segundos em 500µl de água destilada. Feito isso, o homogeneizado foi centrifugado a 2000rpm por 5 minutos, onde foi separado o sobrenadante para a dosagem de fosfatase alcalina através do método colorimétrico (kit para determinação de fosfatase alcalina - Labtest®).

6.16- Glicogênio muscular e hepático

Alíquotas de tecido hepático e muscular foram separadas para determinação do glicogênio pelo método colorimétrico com fenol e ácido sulfúrico (LO et al., 1970).

6.17- Lipídios no fígado

A determinação dos teores de lipídios no fígado foi realizada através do método colorimétrico proposto por Nogueira et al. (1990).

6.18- Composição química da carcaça

A carcaça eviscerada foi seca em estufa a 100°C até atingir o peso constante. Depois de seca, foi triturada em liquidificador e sofreu várias lavagens com benzeno, visando a extração da gordura. Posteriormente, foi novamente seca até atingir peso constante em estufa a 100°C. O pó seco, desengordurado obtido e dissolvido em HClO₄ 1N, foi utilizado para a determinação do teor de proteína (LOWRY et al, 1951).

6.19- Análise estatística

Os dados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão. Os procedimentos estatísticos incluíram teste *t* de student e Análise de Variância (ANOVA), seguida de BONFERRONI, onde apropriado. O nível de significância foi pré-estabelecido em 5%.

7 – RESULTADOS

Os resultados da presente Tese de Doutorado encontram-se apresentados na forma de quatro Artigos Científicos (um de Revisão da Literatura) já concluídos, sendo que um já se encontra publicado, dois aceitos (no prelo) e outro já submetido. Estes artigos compõem os quatro capítulos seguintes desta tese. Seguem, abaixo, as referências completas desses artigos:

- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R. Desnutrição: metabolismo protéico muscular e recuperação nutricional associada ao exercício **Revista Motriz (Unesp Rio Claro)**. 14(1): 74-84, 2008. (Publicado / Anexo);
- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R. *Spirulina enhanced the skeletal muscle protein in growing rats*. **European Journal of Nutrition**. 47: 393-400, 2008. (Publicado / Anexo);
- VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determinação da transição metabólica através do teste do lactato mínimo em ratos desnutridos. **Revista da Educação Física (UEM)**. 18(1): 33-39, 2007. (Publicado / Anexo);
- VOLTARELLI, F.A; ARAÚJO, M.B; RIBEIRO, C; MOTA, C.S.A; MELLO, M.A.R. *Spirulina as the dietary protein source for rats recovering from malnutrition: effects on muscle protein and body growth*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2008. (Submetido / Anexo)

Ao final da Tese, em anexo, acham-se três publicações (Artigos de Revisão Bibliográfica) referentes ao período de Estágio de Doutorando realizado na Universidade do Porto – Faculdade de Ciência do Desporto – Porto – Portugal, no período de Março a Setembro de 2007. Tal estágio foi subsidiado pela *Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior* (CAPES) – Modalidade PDEE. Seguem-se as referências completas desses artigos:

- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; DUARTE, J.A.R. Apoptose e exercício físico: efeitos sobre o músculo esquelético. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**. 12 (1): 13-19, 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. **Revista da Educação Física (UEM)**. 18(1): 85-95, 2007.
- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; DUARTE, J.A.R. Apoptose e sarcopenia do músculo esquelético no envelhecimento. **Revista Motriz (Rio Claro)**. 13(2): 137-144, 2007.

CAPÍTULO 1

VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R. Desnutrição: Metabolismo protéico muscular recuperação nutricional associada ao exercício. **Revista Motriz (Unesp Rio Claro)**. 14(1): 74-84, 2008. (Publicado / Em Anexo) (*Revisão da Literatura*).

RESUMO

A desnutrição é, ainda hoje, grave problema médico-social nos países em desenvolvimento. Assim, é de grande interesse o desenvolvimento de procedimentos mais efetivos no seu tratamento. Isso inclui o emprego do exercício físico. O presente estudo teve como objetivo revisar: a) os principais tópicos referentes aos efeitos da desnutrição sobre o organismo, bem como à sua recuperação através da alimentação associada ao exercício físico e b) o metabolismo protéico muscular de ratos em recuperação da desnutrição protéica. Para atingir tal fim, realizou-se uma revisão bibliográfica minuciosa dos principais trabalhos científicos publicados pelo nosso grupo de trabalho, e por outros pesquisadores na área, nos últimos anos.

Palavras-chaves: Desnutrição. Metabolismo protéico muscular. Recuperação nutricional. Exercício físico.

ABSTRACT

As we enter the 21st century and the new millennium, malnutrition remains the single most important factor impairing health and productivity of large human populations, mainly in the developing countries. For this reason, the exploration of alternative treatments, despite of nutritional recovery, became a matter of generalized interest, and this includes the employer of physical exercise. The present study aimed to review: a) the main topics related to malnutrition effects on organism, as well as to its nutritional recovery through refeed and the role of physical exercise and b) the muscle protein metabolism of rats submitted to malnutrition recovery. To reach the objective of the present study, a bibliographic review process was applied and scientific papers published by our work group, and by other researches in this area, were used.

Keywords: Malnutrition. Muscle protein metabolism. Nutritional recovery. Physical exercise.

INTRODUÇÃO

Os efeitos da fome sobre populações têm sido observados desde épocas remotas e descritos através dos tempos. Contudo, pesquisas realizadas utilizando métodos científicos para avaliação da desnutrição, sua prevalência, natureza e abrangência de seus efeitos e integração com outros fenômenos, só tiveram início em épocas recentes.

Em 1928, a antiga liga das nações, sob o patrocínio de sua organização de higiene, procedeu a inquéritos em diferentes países. Foram, então, divulgados relatórios sobre as condições alimentares no mundo, demonstrando que mais de 2/3 da humanidade viviam em permanente estado de fome (CASTRO, 1965).

Mais recentemente, baseado em pesquisas nutricionais realizadas em todos os continentes, a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FOOD, 2001) relatou que, embora em termos percentuais, tenha havido decréscimo na incidência de desnutrição entre 1990 e 1999, em números absolutos 623,7 milhões de pessoas nesses continentes ainda são acometidas por essa carência nutricional.

No Brasil, em 1996, foram efetuados inquéritos sobre o estado nutricional da população de menores de 5 anos, em áreas urbanas e rurais em diferentes regiões (MONTEIRO, 2003). Em áreas urbanas da região Centro-Sul (inclui as regiões

Centro-Oeste, Sudeste e Sul), por exemplo, a prevalência da desnutrição situou-se próximo a 4,6%, enquanto que em áreas urbanas das regiões Norte e Nordeste chegou aos 16,6 e 13,0%, respectivamente.

Há várias décadas a desnutrição protéica vem preocupando autoridades ligadas aos setores de saúde pública, principalmente a Organização Mundial de Saúde (OMS), visto que essa patologia implica em comprometimento funcional de diversos sistemas e órgãos de seus portadores, entre eles, a musculatura esquelética (TORUN; CHEW, 1994). Algumas alterações são totalmente revertidas com a recuperação nutricional, enquanto outras, não.

Por outro lado, sabe-se que a prática regular de atividade física exerce efeitos benéficos para a saúde, tais como aumento da capacidade oxidativa e do crescimento muscular, melhora das condições cardiorrespiratórias e facilitação da mineralização óssea, entre outros (BURNS et al., 2005). Assim sendo, o presente trabalho de revisão visa fornecer uma visão geral sobre: a) os principais tópicos relacionados aos efeitos da desnutrição sobre o organismo, bem como à sua recuperação através da alimentação associada ao exercício físico e b) o metabolismo protéico muscular de ratos em recuperação da desnutrição protéica.

DESNUTRIÇÃO: CARACTERÍSTICAS GERAIS

A desnutrição, ou mais corretamente, as deficiências nutricionais – porque são várias as modalidades de desnutrição – são doenças que decorrem do aporte alimentar insuficiente em energia e nutrientes ou, ainda, com alguma frequência, do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos, geralmente motivado pela presença de doenças, em particular infecciosas (MONTEIRO, 2003).

As conseqüências da desnutrição para o organismo são variadas, entretanto desde as formas leves às mais severas é constante o comprometimento do crescimento. Por essa razão, são utilizados indicadores antropométricos com a finalidade de diagnosticar a desnutrição infantil. O parâmetro mais usado é a adequação percentual do peso corporal do indivíduo em relação à idade. A classificação mais empregada para avaliar o estado nutricional de crianças de 1 a 4 anos é a proposta por Gomes (1946) e prevê três graus para a desnutrição, conforme o déficit ponderal seja de 10 a 24% (primeiro grau ou leve), de 25 a 40% (segundo grau ou moderada) ou maior de 40% (terceiro grau ou grave). *Marasmo e Kwashiorkor* são duas síndromes que

correspondem a manifestações extremas da desnutrição de terceiro grau (TORUN; CHEW, 1994).

O *Kwashiorkor* manifesta-se com maior frequência nos três primeiros anos de vida, especialmente no segundo. 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).

O *Marasmo* instala-se nos primeiros anos, preferencialmente no decorrer do primeiro ano. Tem sido freqüentemente observado em crianças com 6 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 atrofia muscular e redução de gordura subcutânea (TORUN; CHEW, 1994).

Ainda existe considerável discussão sobre as diferenças na etiologia dessas duas síndromes reconhecidas da desnutrição. Embora elas sejam vistas como doenças que marcam os pontos finais do espectro das doenças também conhecidas pelo termo desnutrição protéico-calórica e que foi usado pela primeira vez por Jelliffe em 1966, alguns autores sugeriram que ambas as formas de desnutrição poderiam resultar de um mesmo tipo e grau de privação dietética (SAWAYA, 1985). Outros acreditam que o *kwashiorkor* é basicamente uma deficiência protéica e o marasmo uma deficiência energética. Parece que as diferenças na etiologia podem ocorrer de acordo com as áreas geográficas, tipo de alimento, idade, ausência ou presença de algumas infecções, diarreia etc.

Ambas as doenças ocorrem mais freqüentemente entre crianças e bebês vivendo em zonas pobres dos países em desenvolvimento. Até a década de 1960, o *kwashiorkor* foi considerado a forma de desnutrição predominante, talvez por causa das suas características patológicas e metabólicas exóticas, muito diferentes das doenças encontradas na Europa. Hoje, se sabe, porém, que o marasmo é mais freqüente (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003).

No entanto, apesar do ritmo acelerado com que se processa a redução da desnutrição no Brasil, ainda não existe uma região onde se tenha completado a correção do déficit de estatura de crianças menores de cinco anos. O objetivo de se atingir os valores da curva de referência de crescimento (tabela do National Center of Health Statistics – NCHS – universalmente recomendada) está relativamente próximo de ser

alcançado nas populações urbanas do Sudeste, Sul e Centro- Oeste, mas ainda acha-se bem distante no Norte e Nordeste (MONTEIRO, 2003). Nessas duas regiões, há a prevalência da carência protéica (de forma endêmica), o que pode aumentar a incidência e instalação do *Kwashiorkor* nessa população, sobrepondo-se à instalação do marasmo (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003).

A desnutrição do tipo *Kwashiorkor* pode ser caracterizada pela deficiência de proteína na dieta, além de vitaminas e sais minerais, onde a alimentação ingerida na forma de carboidrato é normal (arroz, milho e mandioca, por exemplo; alimentos de baixo custo), não ocorrendo o mesmo com a ingestão de fontes alimentares ricas em proteínas (como por exemplo, a carne bovina e/ou de aves; alimento de custo elevado). Os danos do *kwashiorkor* para o organismo são principalmente sobre o sistema imunológico, a ponto de qualquer infecção ser mortal para o indivíduo acometido e, ainda, esses danos são, na maioria dos casos, irreversíveis nesse tipo de desnutrição, tornando-a assim uma síndrome com menor grau de adaptação em relação ao marasmo (MENDONÇA, 2003).

A desnutrição durante a fase intra-uterina é assunto que tem sido abordado com destaque a partir da década de 1970. Entretanto, já em 1928, Capper distinguiu prematuros de recém-nascidos pequenos de gestação a termo e, na ocasião, observou-se que os últimos evoluíram para escolares atrasados, potencialmente neuróticos ou psicóticos. Antov (1947) demonstrou que, durante o cerco de Leningrado, na Segunda Guerra Mundial, ocorreu diminuição de cerca de 500 a 600g no peso das crianças ao nascer. Os estudos de Smith (1947), a respeito da desnutrição materna ocorrida na Holanda em 1945, sobre o desenvolvimento fetal, acusaram diminuição de 240g no peso ao nascer. Após essas constatações iniciais, vários foram os trabalhos clínicos e experimentais desenvolvidos nessa área.

Estudos efetuados em animais de laboratório, como ratos, cobaias e macacos, mostraram que a deficiência de proteínas (LATORRACA et al., 1998, GALDINO et al., 2000) ou a restrição alimentar (FERRARI et al., 1992) pré-natais causam retardo no crescimento fetal. Em animais, também, a desnutrição protéica crônica, imposta a várias gerações, resultou em retardo marcante do peso ao nascer, tamanho de órgãos, maturação sexual, comportamento e padrões de aprendizagem (STEWART et al., 1975).

CRESCIMENTO CELULAR: EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO

O crescimento de qualquer órgão pode ser causado por aumento no número de células (hiperplasia), por aumento no tamanho das células já existentes (hipertrofia) ou por ambos os processos simultaneamente. O número total de células pode ser medido, com algumas exceções, determinando-se o conteúdo total de DNA do órgão e dividindo-se por uma constante que representa o conteúdo de DNA por núcleo diplóide na espécie em estudo (WINICK et al., 1972).

Determinado o número de células, o peso médio por célula, o conteúdo protéico por célula, o conteúdo de RNA por célula, entre outros, podem ser avaliados através da determinação da quantidade total de cada um desses elementos e dividindo-se pelo número de células. O resultado pode ser expresso como razões peso/DNA; proteína/DNA; RNA/DNA etc. (WINICK et al., 1972). O aumento do conteúdo de DNA representa um tipo de crescimento, ou seja, aumento do número de células; enquanto que o aumento das razões peso/DNA, proteína /DNA e RNA/DNA representam outro aspecto do crescimento, isto é, o aumento da massa tecidual sem aumento no número de células (WINICK et al., 1972).

Parece claro, à vista do exposto, que numa agressão nutricional na fase de hiperplasia, por interferir com o número de células, poderá levar à lesão irreversível. Ocorrendo insulto na fase de hipertrofia, o efeito poderia ser reversível. Portanto, os efeitos da agressão, em caso de desnutrição, dependem fundamentalmente da fase de desenvolvimento orgânico em que o organismo se encontra. Desse modo, quando a desnutrição se impõe desde o período pré-natal, suas conseqüências tendem a ser mais graves.

Com a finalidade de estudar os efeitos da desnutrição sobre esses padrões de crescimento, Winick e Noble (1996) utilizaram 3 grupos de ratos. Um grupo sob restrição de calorias de zero a 20 dias de idade (época em que todos os órgãos, no caso, estão crescendo por divisão celular exclusivamente); o segundo grupo sob restrição dos 21 aos 42 dias (época em que o cérebro e os pulmões não estão crescendo mais por divisão celular) e o terceiro, dos 64 aos 86 dias (quando todos os órgãos estão crescendo por hiperplasia celular). Após o período de restrição, todos os animais foram realimentados.

Os resultados indicaram que restrição precoce (grupo 1) interferiu com a divisão celular e os animais apresentaram menor número de células em todos os órgãos

estudados, mesmo após a realimentação. Desnutrição tardia (grupo 3) resultou e, decréscimo da razão proteína/DNA (tamanho celular), com recuperação durante a realimentação. Nos animais desnutridos de 21 a 42 dias (grupo 2), todos os órgãos apresentaram redução de proteínas e peso, mas o cérebro e os pulmões apresentaram conteúdo normal de DNA enquanto que os outros órgãos tiveram conteúdo reduzido de DNA. Somente o cérebro e os pulmões recuperaram-se durante a realimentação. Estes dados suportam a hipótese de que a interferência com a divisão celular resulta em efeitos permanentes no organismo.

Albanes et al. (1990) observaram que restrição calórica (40%) imposta por três semanas, iniciada ao desmame, resultou em animais portadores de cólon mais leves, com menor número de células (menor quantidade de DNA total) e com redução da síntese de DNA (captação de ³H timidina) quando comparados a animais bem nutridos. Galdino (1996) constatou redução significativa no teor de DNA (número de células) no coração dos fetos no 19º dia de gestação.

Os efeitos da restrição energética prolongada e subsequente realimentação sobre o músculo esquelético foram estudados em ratos obesos da linhagem Zucker, os quais mostraram marcante perda da massa corporal (64%), com conseqüente perda tecidual e redução no diâmetro das fibras no músculo plantar (BEMBEN et al., 1997). Por outro lado, Bembem e colaboradores (1997) demonstraram que a realimentação aumenta o diâmetro das fibras musculares, o qual se aproxima dos valores normais de ratos bem nutridos. Similarmente, Glore e Layman (1987) mostraram que a recuperação nutricional promove aumento na massa muscular de animais previamente submetidos à desnutrição protéico-calórica.

Nascimento et al. (1990) observaram redução de aproximadamente 50% no peso de ratos desnutridos quando comparados com normais e um importante decréscimo no diâmetro das fibras musculares desses animais. Recentemente, em outro estudo, Ventrucci et al. (2004) observaram uma diminuição de cerca de 78% no peso do tecido muscular de ratos submetidos à desnutrição protéico-calórica.

A perda de tecido muscular na desnutrição protéica pode ser considerada um mecanismo homeostático. A desnutrição protéica promove uma redistribuição funcional das proteínas musculares para disponibilizar nitrogênio necessário para a síntese de proteínas teciduais, formação de células vermelhas e exercer funções imunes. A inter-relação de gordura, músculo e fígado envolve o catabolismo das proteínas

musculares e liberação de precursores da neoglicogênese que serão utilizados pelo fígado. Durante esse processo, corpos cetônicos são sintetizados no fígado a partir da gordura e usados como combustível pelo cérebro e outros órgãos ao invés de glicose (BLACKBURN, 2001).

METABOLISMO PROTÉICO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Síntese Protéica

Uma das principais vias de sinalização de síntese protéica muscular, que é ativada por sinais induzidos por insulina, aminoácidos e exercício de resistência é denominada *Phosphatidylinositol 3-kinase- mammalian target of rapamycin* (PI3K-mTOR) (BOLSTER et al., 2005).

Os mecanismos envolvidos na estimulação da síntese protéica muscular que ocorre em resposta à ativação da via de sinalização PI3K-mTOR podem ser separados em duas categorias temporais: a) mudanças imediatas, isto é, aquelas que ocorrem em menos de uma hora e que podem ser traçadas para aumentar as taxas de tradução de RNAm mediadas por ativação dos fatores de iniciação de tradução e b) mudanças a longo prazo, ou seja, aquelas que ocorrem após várias horas e que são resultado do aumento do número de ribossomos designados para a tradução de RNAm. Além disso, a sinalização de mTOR promove transcrição do DNA ribossomal. Juntos, o aumento da tradução de RNAm codificando proteínas ribossomais e o aumento da transcrição de DNA ribossomal promovem a biogênese de ribossomos. Aumento no conteúdo celular de ribossomos é um mecanismo para elevar a capacidade crônica da célula para sintetizar proteína (FINGAR et al., 2002).

Em estudo realizado por Bodini et al. (2001) relacionando síntese protéica no músculo esquelético e exercício de resistência, observou-se que os dados suportam a idéia de que outro componente da cascata quinase, a sinalização de Akt/mTOR, seja ativada e promova a regulação da translação de RNAm, causando assim, hipertrofia da musculatura esquelética.

O controle central de mTOR como mediador da resposta hipertrófica sob condições de exercício físico de resistência tem sido verificado através de tratamento *in vivo* com rapamycin (um inibidor específico de mTOR), o qual bloqueia quase que completamente a hipertrofia muscular (REYNOLDS et al., 2002), mostrando assim, a

importância da via mTOR na síntese protéica muscular quando da realização de exercício físico.

Contudo, cada uma dessas proteínas pertencentes à via de sinalização PI3K-mTOR (incluindo a proteína Akt) é indispensável para mediar o crescimento da musculatura esquelética e, embora sejam propostas proteínas distintas como potenciais marcadores de hipertrofia muscular, uma resposta coordenada de vias de transdução de múltiplos sinais é essencial para todo o processo (BOLSTER et al., 2004).

Degradação Protéica

Nos últimos anos, os principais mecanismos de degradação protéica ou proteólise foram elucidados. A proteólise muscular ocorre através de vias lisossomal e não lisossomal. A via não lisossomal é controlada pelo sistema ubiquitina-proteossomo, principal responsável na quebra de proteínas miofibrilares e intracelulares de células eucarióticas (TAILLANDIER et al., 2004). A via da ubiquitina é um processo complexo, ativada no músculo durante o catabolismo severo (WRAY et al., 2002). Este processo envolve múltiplos estágios que são proteossomo-dependentes. Incluem a ubiquitinação da proteína a família enzimática ubiquitina E1, E2 e E3 e o proteossomo 26S (ATTAIX, 2001), que dependem de energia fornecida pelo ATP. Além disso, o proteossomo 26S é um complexo proteolítico que consiste de uma partícula central, o 20S, e subunidade proteossomo adicionada por 2 complexos reguladores, o 19S e o 11S, ambos ligados ao terminal da subunidade 20S (GLICKMAN; CHIECHANOVER, 2002).

O exercício excêntrico resulta em lesão do músculo esquelético e estimula a proteólise muscular. De acordo com observações feitas em músculos sob condições de perda de massa muscular (i.e. câncer, trauma), o exercício excêntrico aplicado em sujeitos humanos (ação excêntrico-isocinética do bíceps braquial com a mão não dominante ou *leg press* com extensão do joelho) resultou em aumento dos níveis de ubiquitina-proteossomo, detectado através de biópsia muscular (STUPKA et al., 2001). Corroborando tais resultados, as atividades da enzima proteossoma elevaram-se após 14 dias de exercício excêntrico no músculo vasto-lateral de voluntários saudáveis, também determinado através de biópsia muscular.

Por outro lado, o exercício de *endurance* é conhecido por ter efeitos hipertróficos sobre a musculatura esquelética. Kee et al. (2002) reportaram que em

músculos incubados, retirados de ratos 24 horas após 5 dias consecutivos de exercício progressivo em esteira rolante, a proteólise é consideravelmente reduzida quando comparada com a de animais não exercitados. Este fenômeno está associado à redução da atividade da quimotripsina do proteossoma e das taxas de ubiquitina-proteossoma dependente da hidrólise de caseína nos músculos extraídos de ratos exercitados comparados com não exercitados. Em outro estudo, Willoughby et al. (2000) observaram, em pacientes com lesão na medula espinhal (caracterizados por apresentarem catabolismo) submetidos a 12 semanas de exercício, de modo passivo, realizado em bicicleta ergométrica, que houve decréscimo da expressão de ubiquitina, da enzima E2 e da subunidade 20S proteossoma. Estes resultados sugerem que a supressão da proteólise através da via ubiquitina-proteossoma, após exercício de *endurance*, pode contribuir para o ganho protéico, de maneira aguda ou crônica, também sob outras condições deletérias ao organismo, como por exemplo, na desnutrição protéico-calórica.

RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL: EFEITOS DO EXERCÍCIO

Sabe-se que a prática regular de atividade física exerce efeitos benéficos para a saúde, tais como aumento da capacidade oxidativa e do crescimento muscular, melhora das condições cardiorrespiratórias e facilitação da mineralização óssea, entre outros (POWERS; HOWLEY, 2000). O exercício pode ser, também, benéfico na recuperação nutricional. Ao serem comparados os ritmos do crescimento de crianças entre dois e quatro anos de idade, enquanto se recuperavam de desnutrição em hospitais, verificou-se que as crianças ativas, que participavam de jogos, envolvendo gasto energético moderado, apresentavam não só massa magra como também tiveram maior crescimento linear do que quando seguiam o nível de atividade física de rotina dos hospitais (jogos sedentários) (TORUN; VITERI, 1994).

Em animais de laboratório, os efeitos do exercício sobre o crescimento corporal são dependentes das propriedades mecânicas do exercício e da espécie de animais utilizados (BORER, 1979). Os resultados referentes a estudos realizados em modelos animais de má nutrição são conflitantes. Alguns apontam efeitos positivos do exercício sobre o crescimento e o desenvolvimento (GALDINO et al., 2000), enquanto outros trabalhos não encontram qualquer efeito (ZANELATTO et al., 1992). Nesses estudos foram empregadas diferentes espécies de animais, como camundongos

(ZANELATTO et al., 1992) e ratos (GALDINO et al., 2000), diferentes procedimentos para provocar desnutrição, como jejum intermitente (SAKAMOTO; GRUNEWALD, 1987), jejum prolongado e restrição de ingestão protéica (GALDINO et al., 2000, ZANELATTO et al., 1992) e, ainda, diferentes protocolos de atividades físicas, como natação livre (ZANELATTO et al., 1992), natação com sobrecargas de 5% do peso corporal (GALDINO et al., 2000), o que torna difícil a comparação dos resultados.

Existem muitas evidências epidemiológicas de enfermidades crônicas degenerativas ligadas à desnutrição e à concomitante capacidade de proteção fornecida não só por uma alimentação adequada, mas também por hábitos saudáveis e atividade física moderada e rotineira.

Bass et al. (2005), em estudo abordando revisão da literatura sobre desnutrição protéico-calórica (DPC), reportaram que o exercício físico exerce potencial efeito no aumento da força-pico da musculatura esquelética e atuação da mesma sobre o tecido ósseo, o que leva a um aumento proporcional da mineralização e densidade óssea em crianças acometidas pela DPC.

Duran et al. (2005) verificaram, em ratos submetidos à desnutrição protéica pré-natal, que o sistema de atividade neuro-locomotor dos mesmos foi afetado negativamente se comparados a animais controles. Essa ocorrência resultou em comprometimentos motores graves quando esses animais atingiram a idade adulta.

Tamaki et al. (2004) realizaram estudo com ratos acometidos pela desnutrição protéica e submetidos ao treinamento físico de corrida em esteira rolante por 3 semanas. Esses autores verificaram inibição da osteoporose nesses animais (comum nesse tipo de desnutrição), se comparados com ratos também desnutridos, mas mantidos sedentários, pelo não aumento dos níveis da enzima fosfatase alcalina (marcadora bioquímica da incidência de osteoporose).

Mais estudos são necessários a fim de esclarecer melhor os efeitos do exercício físico sobre a recuperação nutricional sob o ponto de vista do tipo de indução da desnutrição e tipo de exercício empregado, onde nesse último tornam-se importantes ergômetro e intensidade utilizados para esse fim.

REFERÊNCIAS

ALBANES, S. D.; SALBE, A. D.; LAVANDER, D. A.; TAYLLOR, P. R.; NIXON, D.W.; WINICK, M. The effect of early caloric restriction on colonic cellular growth in rats. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 13, n. ½, p. 73-80, 1990.

ANTOV, A. N. Children born during the siege in Leningrad in 1942. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 30, n. 3, p. 250-259, 1947. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(47\)80160-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(47)80160-X)

ATTAIX, D. Regulation of proteolysis. **Current Opinion of Clinical Nutrition Metabolism Care**, New York, v.4, p. 45-49, 2001. Disponível em: <http://www.clinicalnutrition.com/pt/re/conutrition/abstract.00075197-200101000-00009.htm;jsessionid=Lt5RnchJQq0Jg1ZJ1h9ntv3YgnK8rTG87DjJWwJnyHLg3NMTvkJT!-2121125135!181195628!8091!-1> Acesso em: 31 jan. 2007.

BASS, E. L.; ESER, P.; DALY, R. The effect of exercise and nutrition on the mechanostat. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interact**, Chicago, v. 5, n. 3, p. 239-254, 2005. Disponível em: <http://www.ismni.org/jmni/pdf/21/08BASS.pdf> Acesso em: 31 jan. 2007.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais = Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 5181-5191, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2003000700019>

BEMBEN, A.; KNEHANS, W.; GLORE, S. R. Changes in the plantaris muscle as an indicator of alterations in lean body mass of obese Zucker rats following prolonged energy restriction and subsequent partial recovery. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 277-284, 1997. <http://dx.doi.org/10.1007/s004210050248>

BLACKBURN, G. L. Pasteur's quadrant and malnutrition. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 3, p. 373-378, 2001. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb16111.x> Reprinted by permission from **Nature**, New York, v. 409, p. 397-401, 2001.

BODINI, S. C.; STITT, T. N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W. O.; SDTOVER, G. L.; BAUERLEIN, R.; ZLOTCHENKO, E.; SCRIMGEOUR, A.; LAWRENCE, J. C.; GLASS, D. J.; YANCOPOULOUS, G. D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo*. **Nature Cell Biology**, London, v. 3, p. 1014-1019, 2001. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1101-1014>

BOLSTER, D. R.; JEFFESRON, L. S.; KIMBALL, S. R. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 63, n. 2, p. 351-356, 2004. <http://dx.doi.org/10.1079/PNS2004355>

BORER, K. T. Characteristics of growth-inducing exercise. **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 713-720, 1980. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(80\)90402-3](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(80)90402-3)

BURNS, S. I.; STONE, J.; HOPPER, J. L.; SEEMAN, E. Diet and exercise during growth have site specific skeletal effects: a co-twin control study. **Osteoporosis International**, London, v. 16, n. 10, p. 1225-1232, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-004-1830-z>

CAPPER, A. Fate and development of the immature and of the premature child: clinical study. **American Journal of Diseases of Children**, New York, v. 35, p. 362-388, 1928.

CASTRO, J. **Geopolítica da fome**. 7. ed. Rio de Janeiro: Brasiliense, 1965.

DURAN, P.; CINTRA, L.; CALLER, J. R.; TONKISS, J. Prenatal protein malnutrition induces a phase shift advance of the spontaneous locomotor rhythm and alters the rest/activity ratio in adult rats. **Nutritional Neuroscience**, Oxon, v. 8, n. 3, p. 167-172, 2005. <http://dx.doi.org/10.1080/10284150400026117>

FERRARI, F.; GABRIELLE, P. R. M.; MELLO, M. A. R. Restrição alimentar durante a gestação e suas implicações sobre o binômio mãe/feto: um modelo experimental utilizando ratas jovens e adultas. **Alimentos e Nutrição**, Campinas, v. 4, p. 45-56, 1992.

FINGAR, D. C.; SALAMA, S.; TSOU, C.; HARLOW, E.; BLENIS, J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its down-stream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E.

Genes & Development, Chicago, v.16, n. 12, p. 1472-1487, 2002. Disponível em: <http://www.genesdev.org/cgi/content/abstract/16/12/1472> Acesso em: 31 jan. 2007.

FOOD AND ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Committee on World Food Security. **Assessment of the world food security situation**. Twenty-Seventh Session, Rome, May 28 - June 1, 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/003/X9563E.htm> Acesso em: 31 jan. 2007.

GALDINO, R. **Atividade física e ingestão da dieta hipoprotéica durante a gestação em ratas: efeitos sobre a gestante e o desenvolvimento fetal**. 1996. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Motricidade) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1996.

GALDINO, R.; ALMEIDA, C. C. S.; LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Protein malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to exercise training. **Nutrition Research**, New York, v. 20, n. 4, p. 527, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00144-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00144-5)

GLICKMAN, M. H.; CHIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction of the sake of construction. **Physiological Reviews**, New York, v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00027.2001>

GLORE, S. R.; LAYMAN, D. K. Cellular development of skeletal muscle of rats during recovery from prolonged undernutrition. **Journal of Nutrition**, Chicago, v. 117, n. 10, p. 1767-1774, 1987. Disponível em: <http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/117/10/1767> Acesso em: 31 jan. 2007.

GOMES, F. Desnutrition. **Bulletin Hospital**, Montreal, v. 3, p. 543-551, 1946.

JELLIFFE, D. B. **The assessment of the nutritional status of the community: with special reference to field surveys in developing regions of the world**. Geneva, World Health Organization, 1966. (Monograph Series. World Health Organization, v. 53)

KEE, A. J.; TAYLOR, A. J.; CARLSSON, A. R.; SEVETTE, A.; SMITH, R. C.; THOMPSON, M. W. IGF-I has no effect on post exercise suppression of the ubiquitin-

proteosome system in rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, New York, v. 92, p. 2277-2284, 2002. <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.01030.2001>

LATORRACA, M. Q.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; MELLO, M. A. R. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps on insulin action in rats. **Journal of Nutrition**, Chicago, v. 128, p. 16432-1649, 1998. Disponível em: <http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/128/10/1643> Acesso em: 31 jan. 2007.

MENDONÇA, R. **O paradoxo da miséria**. CSC <http://www.desnutricao.org.br> Acesso em: 1 dez. 2003.

MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil: implicações para políticas públicas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 17, n. 48, p. 7-20, 2003. Disponível em: http://hygeia.fsp.usp.br/~nupens/monteiro_pobrezafome.pdf Acesso em: 31 jan. 2007.

NASCIMENTO, O. J.; MAD, K.; GUEDES e SILVA, J. B.; SOARES FILHO, P. J.; HAHN, M. D.; COUTO, B.; FREITAS, M. R. Striated muscle in protein malnutrition: an experimental study in albino rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 395-402, 1990.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2000.

REYNOLDS, T.H; BODINE, S.C; LAWRENCE, J.C. Control of Ser²⁴⁴⁸ phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 277, n. 20, p. 17657-17662, 2002. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M201142200>

SAKAMOTO, K.; GRUNEWALD, K. K. Beneficial effects of exercise on growth of rats during intermittent fasting. **Journal of Nutrition**, Chicago, v. 117, n. 2, p. 390-395, 1987. Disponível em: <http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/117/2/390> Acesso em: 31 jan. 2007.

SAWAYA, A. L. **Aspects of energy metabolism in protein malnourished rats**. 1985. Thesis (PhD) - Darwin College, Cambridge, 1985.

SMITH, C. A. Effects of maternal undernutrition upon the newborn infant in Holland (1944-5). **Journal of Pediatric**, Chicago, v. 29, p. 517-534, 1947.

STEWART, J. C.; PRECE, R. F.; SHEPPARD, H. G. Twelve generation of marginal protein deficiency. **British Journal of Nutrition**, London, v. 33, p. 233-253, 1975.

STUPKA, N.; TARNOPOLSKY, M. A.; YARDLEY, N. J.; PHILIPS, S. M. Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. **Journal of Applied Physiology**, New York, v. 91, p. 1669-1678, 2001. Disponível em: <http://jap.physiology.org/cgi/content/abstract/91/4/1669> Acesso em: 31 jan. 2007.

TAILLANDIER, D.; COMBARET, L.; POUCH, M. N.; SAMUELS, S. E.; BÉCHET, D.; ATTAIX, D. The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 63, p. 357-361, 2004. <http://dx.doi.org/10.1079/PNS2004358>

TAMAKI, H.; SUN, L.; OHTA, Y.; KATSUYAMA, N.; ISHIMARU, T.; CHINEN, I. Running inhibits osteoporosis induced by protein-deficient (PD) in food intake. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 68, n. 7, p. 1578-1580, 2004. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.68.1578>

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, 1994. v. 2, p. 950-976. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=S5oCjZZZ1ggC&hl=pt-BR> Acesso em: 31 jan. 2007.

TORUN, B.; VITERI, F. Influence of exercise on linear lactate. **European Journal of Clinical Nutrition**, Memphis, v. 48, n. 1, p. 5186-5190, 1994.

VENTRUCI, G.; SILVA, L. G. R.; MELLO, M. A. R.; MARCONDES, M. C. C. G. Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats.

Nutrition, New York, v. 20, n. 2, p. 213-217, 2004.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2003.10.014>

WILLOUGHBY, D. S.; PRIEST, J. W.; JENNINGS, R. A. Myosin heavy chain isoform and ubiquitin protease mRNA expression after passive leg cycling in persons with spinal cord injury. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Chicago, v. 81, p. 157-163, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9993\(00\)90134-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9993(00)90134-5)

WINICK, M.; BASEL, J. A.; ROSSO, P. Nutrition and cellular growth. In: WINICK, M. **Nutrition and development**. New York: John Willey, 1972. p. 49-97.

WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 89, n. 3, p. 300-306, 1966. Disponível em: <http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/89/3/300> Acesso em: 31 jan. 2007.

WRAY, C. D.; MAMMEN, J. M.; HASSELGREEN, P. O. Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. **Nutrition**, New York, v. 18, n. 11/12, p. 971-977, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00985-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00985-1)

ZANELATTO, R. A.; FERRARI, F.; MELLO, M. A. R. Desnutrição protéico-calórica e crescimento corporal. Influência do exercício na recuperação nutricional de ratos. **Alimentos e Nutrição**, Campinas, v. 8, p. 7-16, 1992.

CAPÍTULO 2

VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R. *Spirulina* melhora o metabolismo de proteína da musculatura esquelética de ratos em processo de crescimento. **European Journal of Nutrition**. 47: 393-400, 2008. (Artigo Original). Publicado/Em anexo.

RESUMO

Apesar de estarmos no século XXI e no novo milênio, a desnutrição ainda é considerada importante fator que compromete a saúde e a produtividade de grande parte da população mundial. Por essa razão, a exploração de fontes alternativas de proteína torna-se extremamente importante. O presente estudo avaliou os efeitos da alga verde-azulada *spirulina*, como única fonte de proteína na dieta, sobre o metabolismo protéico no músculo esquelético de ratos jovens. Dieta com 17% de proteína na forma de *spirulina* (S) foi comparada com dieta contendo a 17% de proteína na forma de caseína [AIN 93] (C) em ratos wistar jovens (30 dias). Proteínas totais, DNA, taxas de síntese (quantidade de ^{14}C fenilalanina incorporado em proteína) e de degradação (liberação de tirosina) protéicas foram mensurados no músculo sóleo isolado dos animais bem como a expressão de miosina (*western blotting*) no músculo gastrocnêmio. Peso (C= $427,3 \pm 8,6$; S= $434,6 \pm 7,7$ g) e comprimento corporais (C= $25,4 \pm 0,2$; S= $25,6 \pm 0,2$ cm) não diferiram entre os grupos ao final do experimento. As concentrações de proteínas totais (C= $2,9 \pm 0,1$; S= $2,7 \pm 0,1$ mg/100mg) e de DNA (C= $0,084 \pm 0,005$; S= $0,074 \pm 0,005$ mg/100mg) no músculo sóleo foram similares em ambos os grupos. As taxas de degradação protéica (C= $427,5 \pm 40,6$; S= $476,7 \pm 50,5$ pmol/mg.h) não diferiram entre os dois grupos, mas as taxas de síntese protéica (C= $17,5 \pm 1,0$; S= $25,2 \pm 1,9$ pmol/mg.h) apresentaram-se mais elevadas ($p < 0,05$; teste t) no grupo *spirulina*, assim como a expressão da proteína miosina, quando comparado ao grupo caseína. *Spirulina* mostrou possuir adequada qualidade protéica para a manutenção do crescimento

corporal e da homeostase bioquímica em ratos. Mais estudos são necessários afim de esclarecer os mecanismos envolvidos nos efeitos da *spirulina* contida na dieta sobre o metabolismo protéico muscular.

Palavras-chaves: músculo esquelético; *spirulina*; proteína.

INTRODUÇÃO

O uso de algas marinhas na alimentação humana é antigo. No oriente, particularmente, cada fonte alternativa de alimento tem sido extensivamente investigada, na esperança de impedir que a deficiência protéica, que caracteriza o status nutricional das populações menos favorecidas, seja difundida (KAY, 1991; SIMPORE et al., 2006). Atualmente, em função da presença constante de proteínas de baixo valor nutritivo na alimentação em todo o mundo e da necessidade urgente do aumento da disseminação de alimentos de boa qualidade, a exploração de algas marinhas (biomassas) como fonte alimentar torna-se de grande interesse.

Spirulina é uma alga marinha de coloração verde-azulada, de formato helicoidal, e comprimento de 0,2-0,3 mm (HADENSHOG., HOFSTEN, 1970; COSTA et al., 2006). O mérito especial dessa alga consiste em ser uma fonte alimentar que contém 65-70 % de proteína, com base no peso seco; quantidade essa maior que a encontrada em outras fontes naturais de alimentos. Além disso, possui todos os 8 aminoácidos essenciais para o homem (LI et al., 2006). Essa alga cresce normalmente em lagos alcalinos localizados em zonas áridas. Embora a água alcalina desses lagos não possa ser utilizada para a irrigação, ela pode ser útil no cultivo de *spirulina* (KAY, 1991; SIMPORE et al., 2006). Uma vez que a *spirulina* possui taxas rápidas de reprodução, dividindo-se três vezes ao dia, uma extensão (como por exemplo, um lago) devotada totalmente ao cultivo dessa alga tem a capacidade de produzir e oferecer proteína em quantidade 125 vezes maior do que as mesmas áreas utilizadas para o cultivo de milho, 70 vezes maior do que a proteína oferecida pelos peixes e 600 vezes maior se comparada com a proteína obtida através da carne bovina (FURST, 1978; BRANGER et al., 2003).

De acordo com avaliações prévias, a *spirulina* parece ser boa fonte alimentar de proteínas para seres humanos. Ela possui aceitação adequada e não parece exercer nenhum efeito tóxico, embora apresente digestibilidade reduzida (SAUTIER., TREMOLIERES, 1975; SIMPORE et al., 2005). Estudos mais detalhados sobre o valor

nutricional da *spirulina* têm sido conduzidos em roedores, especialmente ratos. Os estudos utilizando esses animais investigaram uma variedade de parâmetros, como crescimento corporal (CONTRERAS et al., 1979; MARANESI et al., 1984; TRANQUILLE et al., 1994; SALAZAR et al., 1996), taxas de eficiência protéica (PER) e de utilização líquida de proteína (NUP) (BOURGES et al., 1971; NARAYAN et al., 2005), maturação sexual (CONTRERAS et al., 1979), performance reprodutiva (SALAZAR et al., 1996), status hematológico (KAPOOR., METHA, 1998), toxicidade (TRANQUILLE et al., 1994; SALAZAR et al., 1996; CHEN., Pan, 2005), entre outros. *Spirulina* provou ser adequada para a manutenção de todos esses marcadores fisiológicos, em níveis normais, e não produziu efeitos adversos após tratamento crônico. No entanto, as informações sobre os efeitos da *spirulina* sobre tecidos com alta taxa metabólica, como o músculo esquelético, examinados aos níveis celular e molecular são escassas. O presente estudo foi delineado para avaliar os efeitos da *spirulina* como única fonte de proteína contida na dieta de ratos jovens sobre as taxas de síntese e degradação protéicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e dietas

Todos os experimentos envolvendo animais, no presente estudo, seguiram as resoluções específicas Brasileiras de Bioética de Experimentos com Animais (Lei número 6.638 de 8 de Maio de 1979; Decreto número 24.645 de 10 de Julho de 1934, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Ratos wistar jovens (30 dias de idade no início do experimento), pesando $231,1 \pm 22,1$ g e medindo (comprimento focinho-ânus) $20,6 \pm 1,3$ cm, provenientes da UNESP- Universidade Estadual Paulista (Campus Botucatu), foram separados aleatoriamente e alimentados com dietas isocalóricas, contendo proteína na forma de *spirulina* (*Spirulina maxima* em pó adquirida comercialmente através da All Chemistry do Brasil Ltda) ou de caseína (proteína do leite) até a idade adulta (90 dias de idade). A dieta de caseína continha 17% de proteína (caseína), 64% de carboidrato, 7% de lipídio e 5% de fibra, de acordo com a dieta AIN-93 (REEVES et al, 1993). A dieta de *spirulina* continha a mesma quantidade de proteína, carboidrato, lipídio e fibra se comparada à dieta de caseína, diferenciando-se apenas quanto à fonte protéica utilizada. O conteúdo total de proteína de ambas as dietas foi avaliado e corrigido segundo Kjeldahl *nitrogen assay* (ALBANESE., ORTO,

1963). As misturas de minerais e vitaminas foram corrigidas para os conteúdos de mineral e vitamina encontrados na *spirulina* em pó. Detalhes da composição de ambas as dietas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das dietas (g/kg)

Componentes	Caseína 17%*	<i>Spirulina</i> 17%
<i>Spirulina</i> (65% proteína)**	-	280.0
Casein (84% proteína)***	202.2	-
Amido de milho	397.0	386.0
Dextrina	130.5	130.5
Sacarose	100.0	100.0
Óleo de soja	70.0	70.0
Fibra Alimentar (microcelulose)	50.0	50.0
Mistura de vitaminas	35.0	35.0
Mistura de minerais	10.0	10.0
L-cistina	3.0	3.0
Colina	2.5	2.5

* De acordo com a dieta para fase de crescimento, período de gestação e lactação de roedores – AIN – 93G (REEVES et al., 1993)

** Valores corrigidos para o conteúdo de proteína em *spirulina* (ALBANESE., ORTO, 1963)

*** Valores corrigidos para o conteúdo de proteína em caseína (ALBANESE., ORTO, 1963)

A composição da *spirulina* em pó foi a seguinte: Análise Geral (%): proteína 64,7; carboidratos 15; lipídios 6; minerais (cinza) 7; fibra 8; Minerais (mg/10g): cálcio 70; ferro 15; fósforo 80; magnésio 40; zinco 0,3; manganês 0,5; sódio 90; potássio 140; minerais (mcg/10g): selênio 10; cobre 120; cromo 25. Vitaminas (por 10g): vitamina A 23000UI, beta-caroteno 14mg; vitamina D 1200UI; vitamina E 1,0 mg; vitamina K 200 mcg; biotina 0,5 mcg; inositol 6,4 mg; tiamina 0,35 mg; riboflavina 0,4 mg; niacina 1,4 mg; piridoxina 80 mcg; folato 1,0 mcg; cianocobalamina 20 mcg; ácido pantotênico 10 mcg. Aminoácidos essenciais (mg/10g): isoleucina 350; leucina 540; lisina 290; metionina 140; fenilalanina 280; treonina 320; triptofano 90; valina 400. Aminoácidos não-essenciais (mg/10g): alanina 470; arginina 430; ácido aspártico 619; cistina 60; ácido glutâmico 910; glicina 320; histidina 100; pralina 270; serina 320; tirosina 300. Aminoácidos totais (g/10g): 6,2.

Durante o experimento, os ratos tiveram livre acesso ao alimento e à água e foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola), sob ciclo claro-escuro de 12 horas, na temperatura de 25°C. A ingestão alimentar foi monitorada diariamente e peso e comprimento corporais foram registrados uma vez por semana.

Extração tecidual

Ao final do período de experimento, todos os animais foram sacrificados por decapitação. Amostras sanguíneas foram coletadas para determinações das concentrações séricas de glicose, proteínas totais, albumina e ácidos graxos livres (AGL) (NOGUEIRA et al, 1990). Amostras do tecido hepático foram coletadas para avaliação das concentrações de lipídios totais (NOGUEIRA et al, 1990), proteína total (LOWRY et al, 1951) e DNA (GILES., MEYERS, 1961). O músculo sóleo esquerdo foi avaliado quanto às concentrações de proteína total e DNA. Fatias longitudinais (70mg) do músculo sóleo direito foram obtidas para determinação das taxas de síntese e degradação protéicas. A carcaça eviscerada foi seca em estufa a 100°C até atingir o peso constante. Depois de seca, foi triturada em liquidificador e sofreu várias lavagens com benzeno, visando a extração da gordura. Posteriormente, foi novamente seca até atingir peso constante em estufa a 100°C. O pó seco, desengordurado obtido e dissolvido em HClO₄ 1N, foi utilizado para a determinação do teor de proteína (LOWRY et al, 1951).

Síntese protéica

Fatias longitudinais (70mg) musculares foram pré-incubadas por 30 minutos em meio RPMI-1640 (com glutamina e sem fenol vermelho e bicarbonato de sódio), suplementado com albumina sérica bovina desengordurada (BSA) [0,1%] e insulina [100u/ml] e saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio RPMI com a mesma suplementação, contendo ¹⁴C fenilalanina [0,05 uCi/ml] e incubadas por 2 horas. Ao final da incubação, as fatias musculares foram homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) 5% e centrifugadas a 2000rpm por 15 minutos a 4°C. O material TCA-insolúvel foi lavado 3 vezes com TCA 5%. O precipitado resultante foi dissolvido em SDS 10%, à temperatura ambiente por 30 minutos, para a determinação do conteúdo protéico e da radioatividade incorporada às proteínas musculares. O conteúdo de

proteína muscular foi determinado pelo método folin fenol (LOWRY et al, 1951) e a radioatividade incorporada à proteína muscular foi medida com o auxílio de um cintilador. A síntese protéica foi calculada dividindo-se a radioatividade incorporada pela radioatividade específica da fenilalanina no meio de incubação e expressa como nanomoles de fenilalanina por miligrama de proteína por 2 horas.

Degradação protéica

A liberação de tirosina pelo músculo isolado na presença de ciclohexamida foi utilizada como índice da degradação protéica, conforme descrito previamente por Fulks et al. (FULKS et al, 1975). Este método vale-se do fato de que o aminoácido tirosina não é sintetizado nem degradado pelo músculo esquelético. Fatias longitudinais musculares (70mg) foram pré-incubadas em tampão Krebs-Ringer [NaCl 1,2 mmol/L; KCl 4,8 mmol/L; NaHCO₃ 25 mmol/L; CaCl₂ 2,5 mmol/L; KH₂PO₄ 1,2 mmol/L e MgSO₄ 1,2 mmol/L – pH 7,4] suplementado com glicose [5,5 mmol/L], BSA [1,34%], insulina [5u/ml] e ciclohexamida [5,0 mmol/L], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio de mesma composição e incubada por 2 horas. Ao final da incubação, amostras do meio de incubação foram utilizadas para determinação do teor de tirosina pelo procedimento de WAALKES & UDENFRIEND (1957).

Análise por *Western Blotting*

Fatias do músculo gastrocnêmio direito foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (TH) (20 mmol/L Tris, 1mM dithiothreitol, 2 mmol/L ATP e 5 mmol/L MgCl₂) e centrifugadas a 15.000 g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante resultante foi analisado para o conteúdo total de proteína (BRADFORD, 1976).

Amostras de proteína do músculo gastrocnêmio (5µg) foram incorporadas a géis de sódio dodecil sulfato poliacrilamida 12%, transferidas para membrana de celulose 0.45µm (Hybond-C, Amersham, UK) e bloqueadas por meio de Marvel 5% em tampão de salina PBS, 0,1% tween, pH 7,5. Anticorpo para miosina (Novocastra, New Castle, England) foi utilizado na diluição de 1:250 e o anticorpo secundário, *rabbit anti-mouse*, foi conjugado com peroxidase *horseradish* e foi usado na diluição de 1:1500. Actina foi usada como carga controle, após aplicação de anticorpo

mouse para actina. A expressão da banda foi revelada usando-se ECL quimioluminescência (Amersham, UK). Os blots foram escaneados por densitometria visando quantificar as diferenças. Para isso, utilizou-se *Gel Pro Analyser software* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Análise da Atividade Enzimática

A atividade das enzimas *chymotrypsin-like* e da fosfatase alcalina dos músculos foi mensurada. A atividade da enzima *chymotrypsin-like* foi determinada usando-se o substrato fluorogênico succinil-Leu-Leu-Val-Try-7- amino-4-metilcoumarim (Suc LLVY-AMC; 0,167 mg/ml em 100 mmol/L Tris-HCl, pH7,4; excitação 360 nm, emissão 460 nm). A atividade foi expressa como unidades de fluorescência por miligrama de proteína, como uma porcentagem do grupo control, enquanto que a atividade da fosfatase alcalina foi mensurada usando-se p-nitrofenil fosfato a 37mM (PNPP) como substrato e atividade expressa em nanomoles de nitrofenol formado por micrograma de proteína muscular (MARTINS et al., 2001).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão para o número de ratos (n) indicado. Quando utilizado músculo sóleo para avaliação das taxas de síntese e degradação protéicas, o n se refere ao número de fatias usadas. Os dados foram analisados por teste *t* de *student* não-pareado. O nível de significância foi pré-estabelecido em 5%.

RESULTADOS

Após 8 semanas de tratamento com as dietas, não houve diferenças entre os ratos alimentados com caseína e *spirulina* quanto a peso e comprimento corporais, ingestão alimentar (Tabela 2) e composição química da carcaça (Tabela 3). Concentrações séricas de proteína total sérica, albumina, glicose e AGL apresentaram-se similares nos dois grupos (Tabela 4). Pesos do fígado (Tabela 5) e do músculo sóleo (Tabela 6), bem como o conteúdo de proteína total e DNA e a razão proteína/DNA nesses órgãos não diferiram entre os grupos. A atividade celular do músculo, analisada

pela atividade da fosfatase alcalina no músculo gastrocnêmio, foi similar em ambos os grupos (C= 11.78 ± 1.02 ; S= 10.49 ± 0.69 nmol. μg proteína⁻¹).

Tabela 2: Peso corporal (g) e comprimento corporal (cm) ao final do experimento e ingestão alimentar (g/100g de peso corporal) durante o experimento.

	Caseína	<i>Spirulina</i>
Peso corporal	427,3±8,6	434,6±7,7
Comprimento corporal	25,4±0,2	25,6±0,2
Ingestão alimentar	8,5±0,1	7,9±0,2

Resultados expressos como média \pm erro padrão de 14 ratos por grupo.

Tabela 3: Conteúdo de água (g/100g), gordura (g/100g) e proteína (g/100g) na carcaça dos animais ao final do experimento.

	Caseína	<i>Spirulina</i>
Água	61,5±1,0	59,6±2,0
Gordura	20,3±1,3	20,8±0,7
Proteína	13,1±0,7	12,8±0,8

Resultados expressos como média \pm erro padrão de 7 ratos por grupo.

Tabela 4: Concentrações séricas de proteína (g/dl), albumina (g/dl) glicose (mg/dl) e ácidos graxos livres (AGL, em $\mu\text{Eq/l}$) ao final do experimento.

	Caseína	<i>Spirulina</i>
Proteína	7,3±0,1	7,1±0,2
Albumina	3,6±0,3	3,4±0,1
Glicose	119,5±9,3	114,8±9,1
AGL	490,0±42,3	440,0±26,9

Resultados expressos como média \pm erro padrão de 7 ratos por grupo.

Tabela 5: Peso (g/100 g de tecido), conteúdos de proteína total (g/100g) e DNA (g/100g), razão proteína/DNA e gordura total (g/100g) do fígado ao final do experimento.

	Caseína	<i>Spirulina</i>
Peso	3,6±01	3,5±0,1
Proteína total	2,9±0,3	2,6±0,1
DNA	0,125±0,01	0,113±0,05
Razão proteína/DNA	24,1±2,6	23,2±2,1
Gordura total	6,7±0,5	6,6±0,3

Resultados expressos como média ± erro padrão de 7 ratos por grupo.

Tabela 6: Peso (g/100g de tecido), conteúdos de proteína total (g/100g) e DNA (g/100g) e razão proteína/DNA do músculo sóleo ao final do experimento.

	Caseína	<i>Spirulina</i>
Peso	0,053±0,003	0,054±0,002
Proteína total	2,9±0,1	2,7±0,1
DNA	0,084±0,005	0,074±0,005
Razão proteína/DNA	34,4±2,5	33,9±3,9

Resultados expressos como média ± erro padrão de 7 ratos por grupo.

As taxas de degradação protéica bem como a atividade da enzima *chymotrypsin-like* (os quais representam a porção catalítica do sistema proteossoma) nos músculos sóleo e gastrocnêmio, respectivamente, foram similares em ambos os grupos (Figura 1A,B). Por outro lado, as taxas musculares de síntese protéica (sóleo) e o conteúdo de miosina (gastrocnêmio) (análises de expressão de proteína e densitometria) foram significativamente mais elevadas nos animais alimentados com spirulina se comparados ao grupo caseína (Figure 2A,B,C, respectivamente).

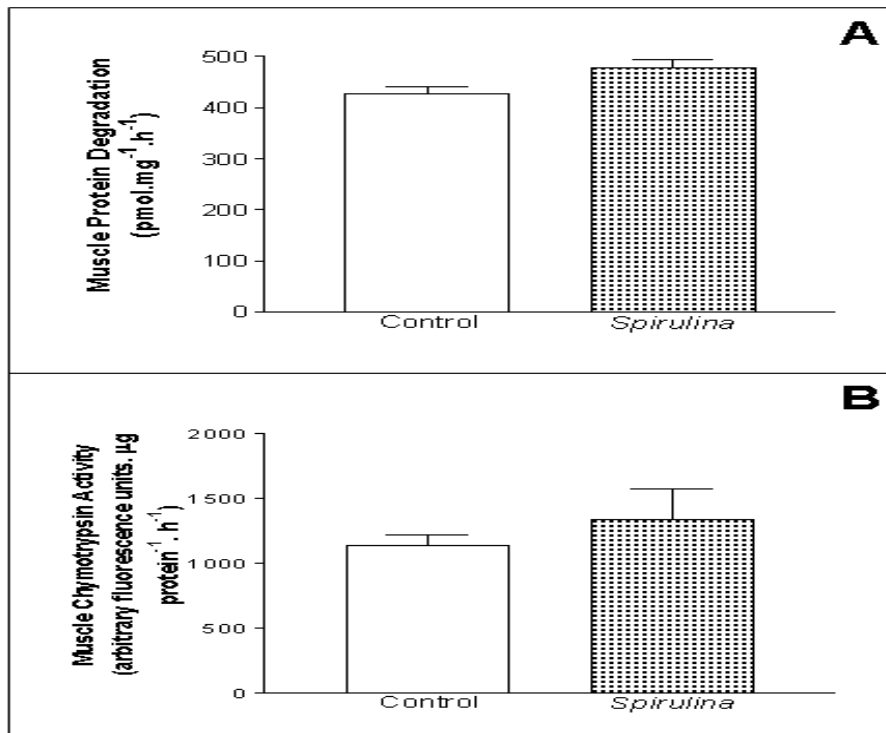


Figura 1: Efeitos da dieta contendo *spirulina* sobre a degradação de proteína (pmol/mg⁻¹.h⁻¹) (A) e atividade da enzima *chymotrypsin-like* no músculo gastrocnêmio (unidades de fluorescência arbitrária. µg proteína⁻¹. h⁻¹) (B) em ratos alimentados com dietas contendo caseína (C) e *spirulina* (S), durante 60 dias. Os resultados foram expressos como média ± Erro Padrão da Média a partir de 13 fatias musculares de cada grupo. *Significativamente diferente (p<0,05; t test) do grupo caseína.

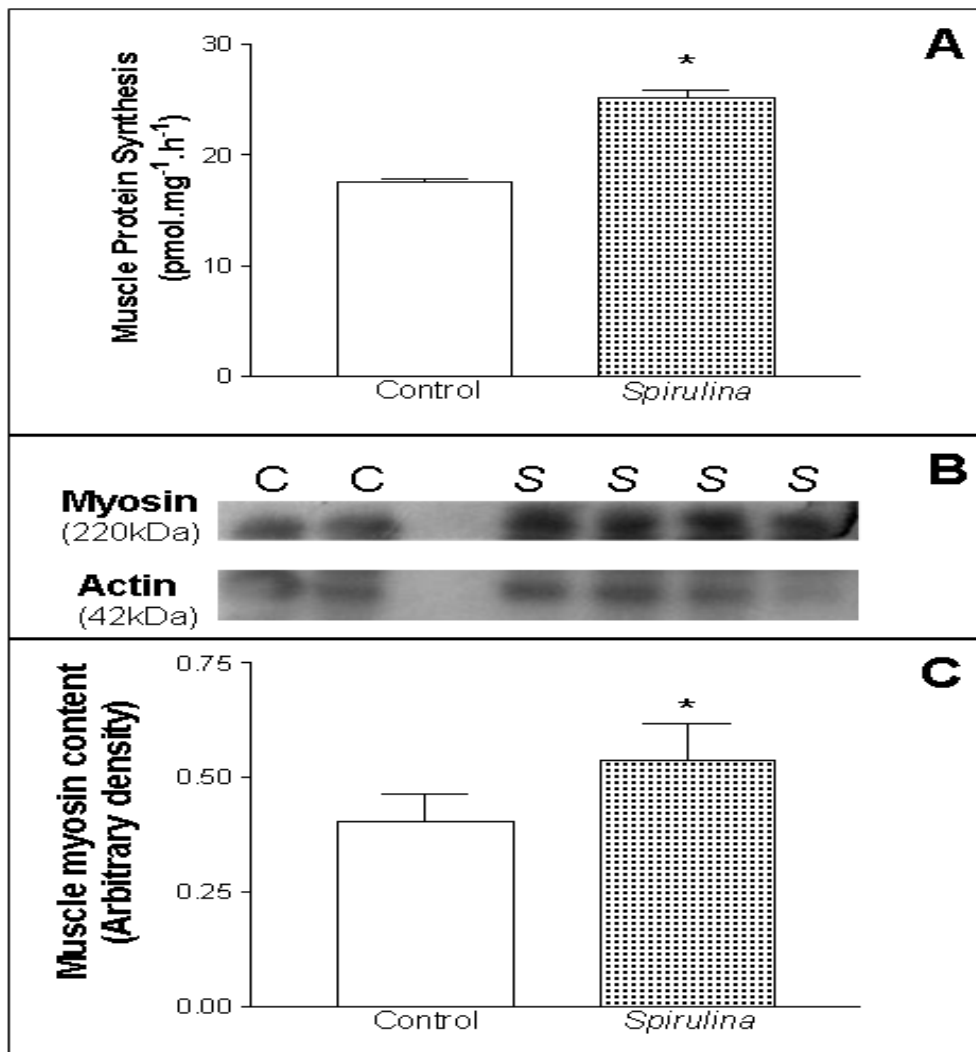


Figura 2: Efeitos da dieta contendo *spirulina* sobre a síntese protéica muscular (pmol/mg⁻¹.h⁻¹) (A) e imagem por *western blotting* das proteínas actina e miosina do músculo gastrocnêmio (B) e análise de densitometria (unidades arbitrárias densitométricas) (C) em ratos alimentados com dietas contendo caseína (C) e *spirulina* (S), durante 60 dias. Os valores de densitometria arbitrária de expressão de miosina foram analisados para oito *western blotting* individuais. Actina foi usada como carga controle e não houve diferença entre os grupos. Os resultados foram expressos como média ± Erro Padrão da Média a partir de 13 fatias musculares de cada grupo. *Significativamente diferente ($p < 0,05$; t test) do grupo caseína.

DISCUSSÃO

Para avaliar o estado nutricional dos animais, foram mensurados peso e comprimento corporais e concentrações séricas de proteína total e albumina, que são indicadores empregados na avaliação de seres humanos (JEEJEEBHOY, 2000) e também freqüentemente usados em estudos com animais (DESAI et al., 1996; PRADA et al., 2001; DEMINGE et al., 2006). No presente estudo, a alimentação de ratos com

dieta contendo proteína na forma de *spirulina*, dos 30 dias até a idade adulta (90 dias), não prejudicou ganho de peso e comprimento corporais. Esses achados estão de acordo com observações prévias, onde a *spirulina* como única fonte protéica na dieta permitiu que ratos crescessem normalmente (CONTRERAS et al., 1979., MARANESI et al., 1984., TRANQUILLE et al., 1994; SALAZAR et al., 1996; CHEN; PAN, 2005). A ingestão alimentar dos animais alimentados com a dieta *spirulina* foi menor, mas não de forma significativa, se comparada com aqueles mantidos com a dieta caseína. Resultado semelhante foi observado por TRANQUILLE et al. (1994) e CHEN; PAN, 2005 em seus estudos. Concentrações de proteínas séricas, especialmente a albumina, estão entre as mais extensivamente estudadas no que se diz às complicações médicas (JEEJEEBHOY, 2000), incluindo a desnutrição protéica (PRADA et al., 2001). Não foi observada diferença entre os ratos alimentados com *spirulina* e caseína em relação às concentrações de proteína e albumina séricas. Ainda, os animais pertencentes ao grupo *spirulina* não demonstraram outras características comumente presentes na desnutrição protéica em crianças (TORUN., CHEW, 1994) e animais (PRADA et al., 2001), como por exemplo, hipoglicemia e concentrações elevadas de lipídios no fígado e AGL no soro. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a *spirulina* como única fonte protéica na dieta não induz sinais ou evidências de desnutrição protéica em ratos.

De acordo com WINICK et al. (1972), o número total de células de um órgão pode ser estimado, com finalidade prática, pela determinação da quantidade total de DNA, enquanto que o tamanho da célula pode ser estimado calculando-se a razão peso/DNA ou a razão proteína/DNA (WINICK et al., 1972). Em ratos, o peso do órgão e teores de proteína aumentam (hipertrofia) até cerca de 100 dias de idade. Por outro lado, a quantidade de DNA (hiperplasia) alcança o seu máximo antes disso em muitos órgãos. Nas fibras da musculatura esquelética, a quantidade total de DNA alcança seu máximo aos 90 dias de idade, ao passo que os níveis de proteína continuam a se elevar, aproximada e lentamente, até os 140 dias. Alterações nutricionais durante os períodos hiperplásicos e/ou hipertróficos teciduais, podem resultar em número e/ou tamanho alterados das células. De acordo com os mesmos autores (WINICK et al., 1972), a mensuração adicional da massa muscular total pode fornecer informações importantes sobre os efeitos do estresse nutricional sobre o crescimento muscular. Em conjunto, nossas observações sobre peso muscular, teores de proteína e quantidade de DNA

indicam que a *spirulina* como única fonte protéica na dieta não impede e/ou não prejudica hiperplasia tampouco hipertrofia em músculo esquelético de ratos jovens.

Para avaliar conseqüências a longo prazo da ingestão de proteína na forma de *spirulina* sobre o metabolismo protéico muscular, foram avaliadas, *in vitro*, as taxas de síntese e degradação protéicas no músculo sóleo. Fatias de músculo sóleo incubadas mostraram balanço protéico negativo, mesmo na presença de insulina, como demonstrado previamente pelo músculo extensor longo de camundongos (SVANBERG et al., 1999). Apesar disso, a incubação de fatias do músculo extensor longo foi considerada uma preparação sensível às alterações *in vivo* do metabolismo protéico pelos nutrientes (SVANBERG et al., 1999). Foi demonstrado que o corte do músculo sóleo aumenta significativamente as taxas de degradação protéica se comparado com músculos não cortados (SEIDER et al., 1980). No entanto, um corte único, separando pela metade o músculo sóleo, procedimento adotado no presente estudo, não alterou de forma significativa essas taxas. SEIDER et al. (1980) observaram que foram necessários pelo menos dois cortes através do músculo sóleo para aumentar de maneira significativa as taxas de degradação protéica. A difusão de oxigênio pode ser melhorada em músculos incubados pelo aumento da tensão de repouso durante a incubação, a qual favorece o anabolismo muscular. De fato, o balanço protéico foi melhorado em alguns estudos pelo aumento da tensão de repouso em músculos durante o processo de incubação (AVRILL et al., 1975) mas não em outros (FRAYN; MAYCOCK, 1979). Em estudos prévios realizados em nosso laboratório, onde aspectos do metabolismo da glicose em músculo sóleo incubado foram avaliados, os resultados não foram alterados pelo grau de tensão ao qual os músculos foram submetidos durante a incubação (STEVANATO et al., 1998; SILVA et al., 2000). Por outro lado, outros autores (SEIDER et al., 1980) demonstraram um aumento da energia provinda do fosfato, em músculo sóleo, por meio do aumento do grau de tensão durante a incubação.

As taxas de degradação protéica no músculo sóleo incubado foram similares em ambos os grupos. A atividade da *chymotrypsin-like*, enzima pertencente à via do sistema catalítico denominado ubiquitina-proteossoma, a principal via de degradação protéica (COUX et al., 1996; LARBAUD et al., 1996), avaliada no músculo gastrocnêmio, não apresentou diferença entre os grupos. Nesse sentido, esses resultados *in vitro* sugerem que a *spirulina* não exerceu efeito indutor sobre a proteólise muscular, como esperado em estados de desnutrição protéica e de caquexia. No entanto, as taxas

de síntese protéica, bem como o conteúdo de miosina (*western blotting*) foram maiores nos animais alimentados com *spirulina*.

O presente estudo foi efetuado *in vitro*, na presença do hormônio insulina, o qual participa na estimulação da síntese protéica muscular, especialmente em animais jovens em crescimento (GARLICK; GRANT, 1988; PROUD, 2006). Foi demonstrado que o teor de proteína na dieta exerce efeito sobre a sensibilidade à glicose na musculatura esquelética de ratos, como resultado de alterações nos primeiros passos na via de sinalização de transcrição celular, incluindo os níveis de receptores de insulina (RI); quanto menor a quantidade de proteína na dieta, maior é a sensibilidade da insulina à glicose (LATORRACA et al., 1998; MELLO et al., 2003). No presente estudo, não foram realizadas avaliações a respeito dos efeitos da qualidade da proteína contida na dieta sobre a sensibilidade insulínica muscular à glicose ou a outros nutrientes. Os aminoácidos exercem, também, um papel importante na regulação da síntese protéica muscular (DARDEVET et al., 2000; DENZI; KLEIN, 2005) e essa modulação pode ser afetada pela quantidade e/ou qualidade da proteína contida na dieta administrada. A maior taxa de síntese protéica determinada no grupo *spirulina*, se comparado ao grupo caseína, pode ser devida a alguma alteração nas cascatas de sinalização responsáveis pela estimulação da síntese protéica na musculatura esquelética desses animais, mediada pela insulina e/ou por aminoácidos contidos na dieta com proteína na forma de *spirulina*, uma vez que essa dieta possui uma quantidade de aminoácidos de cadeia ramificada ligeiramente maior se comparada a dieta que utiliza a caseína como fonte protéica. Nesse sentido, um interessante passo a ser investigado futuramente é o papel da via mTOR sobre os efeitos aqui observados.

Sabe-se que os ácidos graxos podem afetar a síntese protéica. Em um interessante estudo (LANG, 2006), os efeitos da circulação elevada de lipídios sobre a síntese protéica de ratos foram verificados. O curto período de elevação dos ácidos graxos livres no plasma por meio de 5 horas de infusão de heparina mais Intralipid diminuiu as taxas de síntese protéica em aproximadamente 25% em condições basais. Portanto, outro aspecto que merece investigações futuras é o efeito dos ácidos graxos livres contidos na *spirulina* sobre o metabolismo protéico muscular.

Os resultados do presente estudo sugerem certo cuidado sobre o valor nutricional e segurança da *spirulina* como fonte protéica. O valor nutricional dessa proteína é demonstrado pelo adequado crescimento corporal e a ausência de

anormalidades bioquímicas nos tecidos de ratos alimentados com essa dieta experimental. No entanto, detectou-se um indicativo de alteração da proteína muscular: o aumento da síntese protéica observado no músculo sóleo.

,1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANESE, A.A; ORTO, L.A. Protein and amino acids. In: Albanese, A.A. ed. **Newer methods of nutritional biochemistry**. N.Y., Academic Press, v. I. cap. 1, 84, 1963.
- ARVILL, A; ADOLFSSON, S; AHREN, K. The use of the levator ani muscle in vitro in evaluating hormone action. **Methods Enzymol.** 39: 94-101, 1975.
- BOURGES, H; SOTOMAYOR, A; MENDONZA, E; CHAVEZ, A. Utilization of the *spirulina* as a protein source. **Nut Rep Int.** 4(1): 31-42, 1971.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 7(72): 48-54, 1976.
- BRANGER, B; CADUDAL, J.L; DELOBEL, M; OUOBA, H; YAMEOGO, P; OUEDRAOGO, D; GUERIN, D; VALEA, A; ZOMBRE, C; ANCEL P. Spiruline as a food supplement in case of infant malnutrition in Burkina-Faso. **Arch Pediatr.** 10(5): 424-431, 2003.
- CHEN, H; PAN, S.S. Bioremediation potential of spirulina: toxicity and biosorption studies of lead. **J Zhejiang Univ Sci B.** 6(3): 171-174, 2005.
- CONTRERAS, A; HERBERT, D.C; GRUBS, B.G; CAMERON, I.L. Blue alga *spirulina* as the sole dietary source of protein in sexually maturing rats. **Nut Rep Int.** 19(6): 749-763, 1979.
- COSTA, D.A; DE MORAIS, M.G; DALCATON, F; REICHERT, C; DURANTE, A.J. Simultaneous cultivation of spirulina plantensis and the toxigenic cyanobacteria microcystis aeruginosa. **Z Naturforsch.** 61(1-2): 105-110, 2006.
- COUX, O; TANAKA, K; GOLDBERG, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Ann Rev Biochem.** 65: 801-847, 1996.
- DANZI, S; KLEIN, I. Posttranscriptional regulation of myosin heavy chain expression in the heart by triiodothyromine. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 288(2): H455-H460, 2005.

- DARDEVET, D; SOMET, C; BALAGE, M; GRIZARD, J. Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. **J Nutr.** 130: 2630-2635, 2000.
- DEMINGE, C; BLOCK, F; PICARD, N; SABBOH, H; BESSON, C; REMESY, C. Mice chronically fed a westernized experimental diet as a model of obesity, metabolic syndrome and osteoporosis. **Eur J Nutr.** (Epub ahead of print), 2006.
- DESAI, M; CROWTER, N.J; LUCAS, A; HALES, C.N. Organ selective growth in the offspring of protein restricted mothers. **Br J Nutr.** 76: 591-603, 1996.
- FRAYN, K.N; MAYCOCK, P.F. Regulation of protein metabolism by a physiological concentration of insulin in mouse soleus and extensor digitorum longus muscle. **Biochem J.** 184: 323-330, 1979.
- FULKS, R.M; LI, J.B; GOLDBERG, J.L. **J Biol Chem.** 250: 290-298, 1975.
- FURST, P.T. *Spirulina*- Nutritious alga, once a staple of Aztec diets could feed many of the world's hungry people. **Human Nature.** 3: 60, 1978.
- GARLICK, P.J; GRANT, I. Amino acid infusion increases the sensitivity of protein synthesis to insulin. Effects of branched chain amino acids. **Biochem J.** 254: 579-584, 1988.
- GILES, A; MEYERS, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. **Nature.** 206 (1 n. 4975): 93, 1961.
- HADENSHOG, G; HOFSTEN, A. The ultra structure of *spirulina plantensis*. A new source of microbial protein. **Physiol Plant.** 23: 209-216, 1970.
- JEEJEEBHOY, K.N. Nutritional assessment. **Nutrition:** 16(7/8): 585-590, 2000.
- KAPOOR, R; METHA, U. Supplementary effect of *spirulina* on hematological status of rats during pregnancy and lactation. **Plant Foods Hum Nutr Aliment.** 29(6): 517-534, 1998.
- KAY, R.A. Micro algae as food and supplement. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 30(6): 555-573, 1991.
- LANG, C.H. Elevated plasma free fatty acids decrease basal protein synthesis, but not the anabolic effect of leucine, in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 291(3): E666-E674, 2006.
- LARBAUD, D; DEBRAS, E; TAILLANDIER, D; SAMUELS, S.E; TEMPARI, S; CHAMPREDON, C; GRIZARD, J; ATTAIX, D. Euglycemic hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia decrease skeletal muscle ubiquitin mRNA in goats. **Am J Physiol.** 271: E505–E512, 1996.

- LATORRACA, M.Q; REIS, M.B; CARNEIRO, E.M; MELLO, M.A.R; VELLOSO, L.A; SAAD, M.J; BOSCHERO, A.C. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and early steps of insulin action in rats. **J Nutr.** 128: 1643-1649, 1998.
- LI, Z.Y; GUO, S.Y; LI, L; CAI, M.Y. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of spirulina plantesis in an air-lift photobioreactor. **Bioresour Technol.** (Epub ahead of print), 2006.
- LOWRY, O.H; ROSEBROUG, N.J; FARR, A.L; RANDALL, R.T. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J Biol Chem.** 193: 265-275, 1951.
- MARANESI, M; BARZANTI, V; CARENINI, G; GENTILE, P. Nutritional studies on *spirulina maxima*. **Acta Vitaminol Enzymol.** 6(4): 295-304, 1984.
- MARTINS, M.J; NEGRAO, M.R; HIPOLITO-REIS, C. Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. **Clin Biochem.** 34: 463–468, 2001.
- NARAYAN, M.S; MANOJ, G.P; VATCHRAVELO, K; BHAGRALAKSHMI, N; MAHADEVASWAMY, M. Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in spirulina plantesis. **Int J Food Sci Nutr.** 56(7): 521-528, 2005.
- MELLO, M.A.R; LUCIANO, E; CARNEIRO, E.M; LATORRACA, M.Q; OLIVEIRA, C.A.M; BOSCHERO, A.C. Glucose homeostasis in pregnant rats submitted to dietary protein restriction. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol.** 113-114: 229-246, 2003.
- NOGUEIRA, D.M; STRUFALDI, B; HIRATA, M; ABDALLA, D.S; IRATA, R.D. (Eds) **Métodos de Bioquímica Clínica**, São Paulo, Pancas Editorial, 1990.
- PRADA, F.J; LUCIANO, E; CARNEIRO, E.M; BOSCHERO, A.C; MELLO, M.A.R. Protein deficiency attenuates the effects of alloxan on insulin secretion on glucose homeostasis in rats. **Physiol Chem Phys Med NMR.** 33: 73-82, 2001.
- PROUD, C.G. Regulation of protein synthesis by insulin. **Biochem Soc Trans.** 34(2): 213-216, 2006.
- REEVES, P.G; NIELSEN, F.H; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final reports of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J Nutr.** 123: 1939-1951, 1993.
- SALAZAR, M; CHAMORRO, GA; SALAZAR, S; STEELE, C.E. Effects of *spirulina maxima* consumption on reproduction and peri and post natal development in rats. **Food Chem Toxicol.** 34(4): 353-359, 1996.

- SAUTIER, C; TREMOLIERES J. Food value of the *spirulina* algae to man. **Ann Nutr Aliment.** 29(6): 517-534, 1975.
- SEIDER, M.J; KAPP, R; CHEG, C.P; BOOTH, F.W. The effect of cutting or stretching skeletal muscle in vitro on the rates of protein synthesis and degradation. **Bioch J.** 188: 247-254, 1980
- SILVA, R.G; ALMEIDA, C.C.A; LUCIANO, E; MELLO, M.A.R. Protein malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to exercise training. **Nutr Res.** 20(4): 527-535, 2000.
- SIMPORE, J; KABORE, F; ZONGO, F; DANSOU, D; BERE, A. Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing spirulina and misola. **Nutr J.** 23(5): 3-9, 2006.
- SIMPORE, J; ZONGO, F; KABORE, F; DANSOU, D; BERE, A; NIKIEMA, J.B; PIGNATELLI, S; BIONDI, D.M; RUBERTO, G; MUSUMECIS, S. Nutrition rehabilitation of HIV-infected and HIV-negative undernourished children utilizing spirulina. **Ann Nutr Metab.** 49(6): 373-380, 2005.
- STEVANATO, E; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R; KOKUBUN, E. Free fatty acid concentration did not affect carbohydrate metabolism in soleus muscle in vitro. **Med Sci Sport Exerc.** 30: S247-S247, 1998.
- SVANBERG, E; SVANINGER, G; SOUSSI, B; LUNDHOLM, K. Mouse extensor digitorum muscle preparation as a tool in nutrition research: a quantitative comparison to in vivo and cell culture experiments. **Nutrition.** 15: 200-207, 1999.
- TORUN, B; CHEW, F. Protein energy malnutrition. **Mod Nutr Health Dis.** 2: 950-976, 1994.
- TRANQUILLE, N; EMEIS, J.J; CHAMBURE, D; BINOT, R; TAMPONNET, C. *Spirulina* acceptability trials in rats. A study for the “Melissa” life-support system. **Adv Space Res.** 14 (11): 167-170, 1994.
- WAALKES, T.P; UDENFRIEND, S. Tyrosine in plasma and tissues. **J Lab Clin Med.** 50(5): 733-736, 1957.
- WINICK, M; BASEL, J.A; ROSSO, P. A Nutrition and cell growth. In: Winick M. **Nutrition and development.** John Wiley & Sons, New York, 49-97, 1972.

CAPÍTULO 3

VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; GOBATTO, C.A. Determinação da transição metabólica através do teste do lactato mínimo em ratos desnutridos. **Revista da Educação Física – UEM**. 18(1): 33-39, 2007. (*Artigo Original*). Publicado/Em anexo.

RESUMO

O presente estudo foi delineado para determinar a transição metabólica aeróbia/anaeróbia (TM) durante o teste do lactato mínimo (TLM), adaptado às condições do rato em exercício de natação, em animais sedentários submetidos à desnutrição protéica. Ratos Wistar jovens foram separados em 2 grupos, de acordo com a quantidade de proteína na dieta: Controle Caseína 17% (C) dos 30 aos 150 dias de idade; Desnutrido Caseína 6% (D) dos 30 aos 150 dias de idade. Para comprovar a eficácia da indução da desnutrição protéica nos animais foram avaliados: a) bioquímica sanguínea: concentrações de AGL, albumina e proteínas totais; b) fígado: concentrações de lipídios e c) quanto aos parâmetros somáticos: peso e comprimento corporais. Para determinação da TM, utilizou-se o TLM adaptado às condições do rato. Foi utilizado teste *t* de student para amostras independentes para indicar diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$) Os ratos do grupo D mostraram hipoalbuminemia, hipoproteinemia e baixo peso corporal, que são sinais de desnutrição. Os ratos desnutridos apresentaram concentração de lactato sanguíneo equivalente à TM ($4,2 \pm 0,4$ mmol/L) inferior à apresentada pelos animais controles ($6,2 \pm 0,1$ mmol/L) em uma mesma carga de exercício (C= $4,9 \pm 0,3$ e D= $4,9 \pm 0,2\%$ do peso corporal).

Palavras-chaves: Teste do lactato mínimo. Ratos. Desnutrição protéica.

INTRODUÇÃO

A desnutrição protéica se caracteriza como um problema de saúde pública, o qual afeta grande parte da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento (DÂMASO, 2001). No Brasil, mesmo em regiões com alta renda per capita, há uma incidência significativa de desnutrição: 6% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996). Em regiões com baixa renda per capita, as taxas de desnutrição são ainda maiores: 17% da população com menos de cinco anos de idade é desnutrida (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003).

O Kwashiorkor é uma manifestação clínica da desnutrição protéica caracterizada pelo decréscimo das taxas corporais totais de síntese e degradação protéicas e diminuição dos níveis de atividade física, sendo esses considerados uma adaptação à ingestão inadequada de proteína. Os sintomas iniciais de deficiência protéica, incluindo perda de peso, atraso no crescimento, fadiga e insuficiência energética, são não-específicos, porque os mesmos podem ocorrer após uma deficiência na quantidade ou na qualidade da proteína (DÂMASO, 2001). A desnutrição protéica representa alterações metabólicas e fisiológicas e resulta em populações adultas com baixa estatura se comparadas às populações bem nutridas (TORUN; CHEW, 1994). Estatura baixa é frequentemente relacionada à redução da capacidade de trabalho e de performance (TORUN; CHEW, 1994), no entanto, são raras na literatura as informações a respeito da capacidade bioquímica de organismos desnutridos para a realização do exercício físico.

Uma vez que existem limitações óbvias em estudos com seres humanos, modelos experimentais oferecem uma condição alternativa para solucionarmos o problema. Por outro lado, a análise dos resultados a partir de estudos com animais é limitada pela falta de informação a respeito da intensidade de exercício suportada pelo animal. Para solucionar essa questão, recentemente nosso grupo desenvolveu um protocolo para avaliação de ratos durante o exercício de natação (VOLTARELLI et al., 2002), baseado nos princípios básicos do teste do lactato mínimo (TLM), originalmente descrito para a avaliação de atletas (TEGTBUR et al., 1993).

O TLM original envolve a realização de exercício supra-máximo por um curto período de tempo, com o objetivo de induzir a hiperlactacidemia antes do início do teste padrão efetuado com cargas progressivas em esteira rolante. O lactato sanguíneo mínimo foi definido como a velocidade na qual a curva em forma de “U”

obtida através dos valores de lactato sanguíneo, durante o teste progressivo, atinge o nadir. Esse valor de lactato sanguíneo mínimo supostamente indica a transição metabólica (TM) aeróbio/anaeróbio durante o exercício (TEGTBUR et al., 1993). Usando o protocolo adaptado para as condições do rato, nós fomos capazes de determinar, com sucesso, a transição metabólica de ratos eutróficos durante exercício de natação (VOLTARELLI et al., 2002).

Partindo do princípio de que a determinação do lactato sanguíneo mínimo requer apenas um teste, efetuado somente em um dia, o mesmo pode ser adequado para ratos submetidos à desnutrição protéica durante o exercício de natação. Portanto, o presente estudo teve como objetivo determinar a transição metabólica aeróbio/anaeróbio pelo teste do lactato mínimo, adaptado às condições do rato durante a natação, em animais sedentários submetidos à desnutrição protéica.

Material e Métodos

Animais

Todos os experimentos envolvendo animais, no presente estudo, seguiram as resoluções específicas Brasileiras de Bioética de Experimentos com Animais (Lei número 6.638 de 8 de Maio de 1979; Decreto número 24.645 de 10 de Julho de 1934, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, jovens (30 dias de idade, no início do experimento), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu/SP. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) e foram alimentados com dietas semi-purificadas e água *ad libitum* bem como mantidos sob ciclo periódico claro e escuro de 12 horas à temperatura média de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Dietas e Grupos

Os ratos (n=20) foram divididos, randomicamente, em dois grupos: controle e desnutrido e alimentados com dietas protéicas isocalóricas (3948 Kcal/kg) normoprotéica (caseína 17%) ou hipoprotéica (caseína 6%) *ad libitum* durante 16 semanas, respectivamente. A dieta normoprotéica conteve quantidades de carboidrato (39,7% de amido de milho; 13,2% de dextrina e 10% de sacarose), gordura (7,0% de óleo de soja), fibra (5,0% de fibra micro celulose), mistura de sais minerais (3,5%) e mistura de vitaminas (1,0%), de acordo com as recomendações do *American Institute of*

Nutrition (AIN-G93) (REEVES et al., 1993). A dieta hipoprotéica conteve mais carboidrato (44,4% de amido de milho; 17,8% de dextrina e 14,9% de sacarose), mas a mesma quantidade de gordura, fibra e misturas de sais minerais e vitaminas se comparada à dieta controle.

Durante todos os procedimentos experimentais, os animais foram pesados e medidos (comprimento focinho-ânus) semanalmente. A ingestão alimentar foi acessada diariamente.

Ao final de 8 semanas, os ratos de ambos os grupos foram submetidos ao TLM de natação para a determinação da TM (% do peso corporal e concentração de lactato sanguíneo / mmol/L).

Adaptação ao meio líquido

A adaptação consistiu em manter os animais em contato com água rasa à temperatura de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 3 semanas, 5 dias por semana por 45 minutos. Nas 2^a e 3^a semanas de adaptação, os mesmos suportaram sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal. O propósito da adaptação foi reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água.

Teste do lactato mínimo (TLM) adaptado às condições do rato

Inicialmente, os animais foram colocados em um tanque cheio d'água suportando sobrecarga equivalente a 15% do peso corporal, realizando exercício de alta intensidade durante 6 minutos (30 segundos de exercício interrompidos por 30 segundos de repouso) para a elevação da concentração de lactato sanguíneo. Após 9 minutos de repouso, os animais iniciaram exercício de natação com intensidades progressivamente maiores (3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,5% do peso corporal), 5 minutos em cada carga (VOLTARELLI et al., 2002). Antes do início do teste (repouso) e a cada troca de carga, amostras de sangue foram coletadas (25 μl) para a determinação da concentração de lactato. Os valores mínimos de lactato sanguíneo (mmol/L) e de carga de exercício (% do peso corporal) foram obtidos através do Microsoft Excel (função polinomial de 2^o grau) e, por sua vez, indicaram a transição metabólica aeróbio/anaeróbio.

Sacrifício dos animais

Ao final do experimento, os ratos foram sacrificados por decapitação para a coleta de material biológico: a) amostras de sangue, para determinação das concentrações de proteínas totais, albumina e ácidos graxos livres (AGL) e b) alíquotas do fígado, para determinação das concentrações de lipídio.

Avaliações bioquímicas

As concentrações séricas de proteínas totais, albumina e AGL e as concentrações de lipídio no fígado foram determinadas pelos métodos colorimétricos, de acordo com NOGUEIRA et al. (1990). A concentração de lactato sanguíneo foi determinada pelo método enzimático, proposto por ENGELS; JONES (1978).

Análise estatística

Os dados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão. Foi utilizado teste t de *student* para amostras independentes para indicar diferenças significativas entre os grupos. O nível de significância foi pré-estabelecido em 5%.

Resultados

Efeitos da dieta hipoprotéica sobre o estado nutricional

Pode-se observar, a partir da Tabela 1, que após 16 semanas, os ratos desnutridos mostraram ganho de peso corporal e incremento no comprimento corporal (comprimento focinho-ânus) reduzidos, baixas concentrações de proteína sérica, albumina e AGL e elevada concentração de lipídio no fígado quando comparados ao grupo controle. Apesar do baixo ganho de peso corporal observado nos animais desnutridos, não foram encontradas diferenças significativas na ingestão alimentar por grama de peso corporal, observada durante o período experimental, entre os dois grupos.

Tabela 1: Ganho de peso corporal (n=10; g), incremento no comprimento corporal (ICC) (n=10; cm) e ingestão alimentar (g/100g de peso corporal/dia) e concentrações de lipídios no fígado (n=8; mg/100mg), albumina (n=8; g/dL), AGL (n=8; μ Eq/L) e proteína (n=8; g/dL) séricos utilizados para avaliação do estado nutricional dos animais.

Parâmetros	Caseína 17%	Caseína 6%
Ganho de peso corporal	435,7 \pm 31,4	222,9 \pm 53,3*
ICC	11,8 \pm 0,8	7,3 \pm 0,9*
Ingestão alimentar	12,6 \pm 0,9	12,5 \pm 0,8
Lipídios no fígado	4,4 \pm 0,5	12,0 \pm 1,2*
Albumina sérica	7,4 \pm 0,4	3,8 \pm 0,4*
AGL sérico	382,5 \pm 31,0	170,0 \pm 23,9*
Proteína sérica	7,5 \pm 0,2	4,5 \pm 0,3*

* Diferença significativa em relação ao grupo Caseína 17% ($p < 0,05$; teste t de student para amostras independentes).

Efeitos da dieta hipoprotéica sobre a concentração de lactato sanguíneo durante o TLM

A concentração de lactato sanguíneo de apenas um rato de cada grupo e sua respectiva carga de trabalho durante o teste do lactato mínimo estão apresentadas nas Figuras 1 e 2. A curva referente aos valores de lactato sanguíneo derivada do teste de natação com cargas incrementais apresentou, como esperado, a forma de “U”. A TM calculada para o rato controle (Figura 1) foi obtida na carga de 4,8% do peso corporal na concentração de 6,3mmol/L de lactato sanguíneo. Em relação ao animal desnutrido (Figura 2), a TM foi calculada na carga de 4,9% do peso corporal a 4,2mmol/L de concentração de lactato sanguíneo. A análise das curvas individuais permitiram a determinação da TM individualizada para cada animal. Os valores médios calculados de TM, expressos como a carga na qual o lactato sanguíneo mínimo apareceu, para todos os animais de ambos os grupos, foi de 4,9 \pm 0,3% do peso corporal a 6,2 \pm 0,1mmol/L de lactato sanguíneo no grupo controle (n=10), enquanto que o grupo desnutrido (n=10) teve a TM obtida na carga de 4,9 \pm 0,2% do peso corporal a 4,2 \pm 0,4mmol/L de lactato sanguíneo.

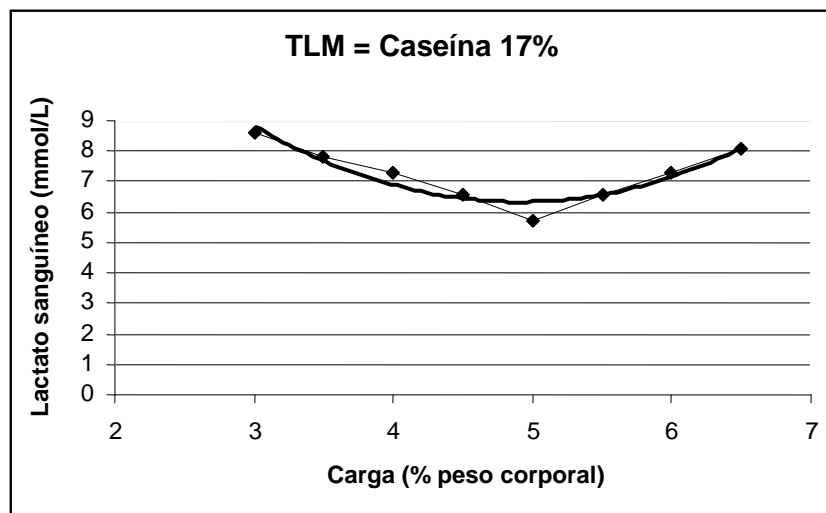


Figura 1: Curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste do lactato mínimo de um rato no estado normal. A curva foi obtida por ajuste polinomial de 2º grau, com auxílio de programa de computador (EXCEL®). A equação a seguir, que definiu a curva, possibilitou o cálculo do menor valor da concentração de lactato sanguíneo (LS) e respectivas cargas de trabalho (peso corporal – pc): $y = 0,1714x^2 - 1,65x + 10,304$ (4,8% do pc à 6,3 mmol/L de LS). Esse menor valor de lactato sanguíneo indicou a carga de trabalho equivalente à TM.

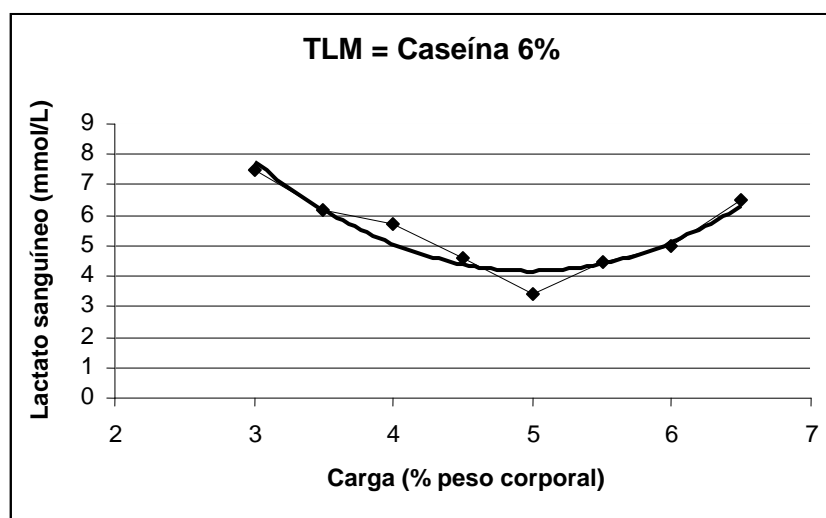


Figura 2: Curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste do lactato mínimo de um rato no estado desnutrido. A curva foi obtida por ajuste polinomial de 2º grau, com auxílio de programa de computador (EXCEL®). A equação a seguir, que definiu a curva, possibilitou o cálculo do menor valor da concentração de lactato sanguíneo (LS) e respectivas cargas de trabalho (peso corporal – pc): $y = 0,2298x^2 - 2,2798x + 9,825$ (4,9% do pc à 4,2 mmol/L de LS). Esse menor valores de lactato sanguíneo indicou a carga de trabalho equivalente à TM.

DISCUSSÃO

Apesar do ritmo acelerado com que se processa a redução da desnutrição no Brasil, ainda não existe uma região onde se tenha completado a correção do déficit de estatura de crianças menores de cinco anos. O objetivo de se atingir os valores da curva de referência de crescimento (tabela do National Center of Health Statistics – NCHS – universalmente recomendada) está relativamente próximo de ser alcançado nas populações urbanas do Sudeste, Sul e Centro- Oeste, mas ainda acha-se bem distante no Norte e Nordeste (MONTEIRO, 2003). Em algumas áreas, a deficiência protéica ainda é prevalente e pode aumentar a incidência e conseqüente instalação do Kwashiorkor (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003). Por essa razão, no presente estudo, nós avaliamos a transição metabólica durante exercício de natação em um modelo animal de desnutrição bem caracterizado (LATORRACA et al., 1998; LATORRACA et al., 1999; MELLO et al., 2003; ALMEIDA; MELLO, 2004). Baixos ganhos de peso e comprimento corporais, hipoalbuminemia, hipoproteinemia e elevado conteúdo de lipídio no fígado, como observado em nossos animais (Tabela 1) mantidos com a dieta hipoprotéica, são sinais comumente encontrados (quadro semelhante) no kwashiorkor infantil (TORUN; CHEW, 1994) e em animais desnutridos experimentalmente (ALMEIDA; MELLO, 2004). Esses resultados indicam a adequação do modelo animal de desnutrição protéica utilizado no presente estudo. Como não houve diferença significativa na ingestão alimentar por grama de peso corporal entre os ratos alimentados com a dietas normoprotéica e hipoprotéica, o modelo, então, representa deficiência protéica e não deficiência protéico-energética.

A concentração sérica de AGL apresentada pelos ratos desnutridos do presente estudo foi significativamente menor em relação aos animais alimentados com a dieta normoprotéica (Tabela 1), confirmando resultados prévios da literatura (ALMEIDA; MELLO, 2004). Estudos usando modelo experimental mostraram que a 6-desaturase, uma enzima chave na síntese dos ácidos graxos essenciais, aparece inibida na situação de jejum e nas deficiências de insulina, proteína e zinco, condições frequentemente observadas em crianças desnutridas (GOLDEN; GOLDEN, 1981).

Em relação ao conteúdo de lipídio no fígado, houve um aumento significativo nos ratos desnutridos quando comparados ao grupo controle. Tal achado confirma estudos prévios (MELLO, 1985; ALMEIDA; MELLO, 2004) e ocorre como

consequência do transporte deficiente de lipídios para fora do fígado em organismos acometidos pela deficiência protéica (COWARD; WHITEHEAD, 1972).

Por razões óbvias, um número significativo de estudos envolvendo exercício e nutrição tem sido conduzido em animais de laboratório, principalmente os ratos, e a concentração de lactato sanguíneo visando a determinação de intensidades de esforço.

Hoje, as mensurações referentes à TM (isto é, limiares) são muito utilizadas no sentido de avaliar o nível de performance de atletas, assumindo que quanto mais alto o limiar, mais alta a capacidade aeróbia do indivíduo. Determinações da TM têm provado, também, ser de grande valor em estudos clínicos utilizando modelos animais, tais como o diabetes mellitus, a obesidade e a desnutrição (MELLO; LUCIANO, 2000).

Em um estudo prévio, a TM de ratos normais e sedentários foi obtida pelo nosso grupo de pesquisa (VOLTARELLI et al., 2002), durante o TLM, na carga média calculada de $4,9 \pm 0,1\%$ do peso corporal dos animais a $7,2 \pm 0,2 \text{ mmol/L}$ de concentração média de lactato sanguíneo. A carga de exercício e a concentração de lactato sanguíneo calculados, equivalentes à TM, observados no rato alimentado com a dieta normoprotéica do presente estudo (Figura 1), foram similares aos valores obtidos anteriormente por nós (VOLTARELLI et al., 2002). Em relação ao rato desnutrido, pode-se observar que a carga de trabalho equivalente à TM obtida através do TLM foi similar (Figura 2) ao controle (Figura 1) e àquela observada em nosso estudo prévio (VOLTARELLI et al., 2002). Por outro lado, a concentração de lactato sanguíneo correspondente à TM foi menor no animal alimentado com a dieta hipoprotéica (Figura 2) se comparado ao animal controle (Figura 1). A mesma diferença entre os animais controle e desnutrido ocorre quando os valores médios de ambos os grupos são considerados.

Alteração similar na cinética de lactato sanguíneo em ratos desnutridos (deficiência protéica) foi reportada em estudo recente (PAPOTI et al., 2003). Esse estudo utilizou a máxima fase estável de lactato (MFEL) como meio de determinação da transição metabólica aeróbio/anaeróbio em ratos durante exercício de natação. A MFEL foi obtida, em ratos normais e em ratos alimentados com a dieta hipoprotéica, na mesma intensidade de esforço ($5,5\%$ do peso corporal). No entanto, houve diferença significativa na concentração de lactato sanguíneo equivalente à intensidade da MFEL

(ratos controle: 5,5 mmol/L de lactato sanguíneo; ratos acometidos pela desnutrição protéica: 4,7 mmol/L de lactato sanguíneo).

Os valores mais baixos de lactato sanguíneo observado nos animais alimentados com a dieta hipoprotéica em relação aos animais controle (alimentados com a dieta normoprotéica) para uma mesma carga de exercício, podem ser, pelo menos em parte, atribuídos às alterações em atividades enzimáticas. Existem dados na literatura indicando redução da atividade de várias enzimas teciduais em organismos submetidos à restrição protéica (PENNEY et al., 1976; NGUYEN; KEAST, 1991; TORUN; CHEW, 1994; SANTOS et al., 1997). Com isso, uma alteração enzimática, originada pela desnutrição protéica, poderia acarretar em inibição da via glicolítica, modificando assim a concentração de lactato sanguíneo durante o exercício.

SANTOS et al. (1997) determinaram a atividade das enzimas glicolíticas (hexoquinase, fosfofrutoquinase, aldolase, fosfohexoseisomerase, piruvato quinase e lactato desidrogenase) e de uma enzima glutaminolítica (glutaminase fosfato-dependente) no timo e em nodos linfáticos mesentéricos de ratos wistar submetidos à desnutrição protéica (6% de proteína da dieta), da concepção até 12 semanas após o nascimento. A atividade da glutaminase não foi afetada pela desnutrição protéica, mas a atividade das enzimas glicolíticas do timo e dos nodos linfáticos foi reduzida pela metade nos ratos desnutridos quando comparados aos controles. Em um estudo empírico prévio, PENNEY et al. (1976) observaram que a atividade da enzima lactato desidrogenase, determinada tanto por eletroforese como por espectrofotometria, foi obtida em valores significativamente menores na musculatura esquelética de ratos desnutridos. Após 5 semanas de recuperação nutricional, os animais previamente desnutridos mostraram um grande aumento na atividade desta enzima glicolítica. Além disso, as atividades máximas da hexoquinase, 6-fosfofrutoquinase, lactato desidrogenase, citrato sintase e glutaminase, as quais proporcionam índices quantitativos de fluxo em várias vias importantes, foram mensuradas na pele de camundongos Balb/c (presença congênita de pelo sob a pele) e Balb/c [nu/nu] (ausência congênita de pelo sob a pele) submetidos a dietas normais e de estresse do ponto de vista nutricional e metabólico (NGUYEN; KEAST, 1991). Esses autores observaram que a atividade de todas as enzimas associadas com o metabolismo energético, na pele dos animais de ambos os grupos, foi suprimida quando os mesmos foram alimentados com uma dieta deficiente em componentes protéicos.

No entanto, para a confirmação dessa hipótese, seria necessário mensurar, principalmente, a atividade da enzima LDH nesses animais.

Outra possível explicação para os menores valores de concentração de lactato sanguíneo observados no grupo desnutrido, para uma mesma carga de exercício em relação aos animais controles do presente estudo, pode estar no fato de que a taxa de remoção do lactato sanguíneo desses animais possa ser superior à produção desse substrato no momento do exercício.

CONCLUSÃO

- Os resultados aqui apresentados mostram que o modelo animal avaliado é adequado para o estudo da desnutrição protéica associada ao exercício;
- Foi possível determinar a transição metabólica aeróbio/anaeróbio em ratos desnutridos através do teste do lactato mínimo durante exercício de natação;
- Os animais desnutridos apresentaram concentração de lactato sanguíneo equivalente à transição metabólica, obtida durante o teste do lactato mínimo, mais baixa em relação aos animais controle para uma mesma carga de exercício, indicando que a restrição protéica altera a cinética de lactato sanguíneo durante a natação em ratos;
- Mais estudos são necessários afim de se identificar as causas reais da diminuição da concentração de lactato sanguíneo, durante a realização do exercício físico, verificada nos animais submetidos à desnutrição protéica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, P.B.L; MELLO, M.A.R. Desnutrição protéica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.** 18(1): 17-30, 2004.
- BATISTA FILHO, M; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. Saúde Pública.** 19(1): 5181-5191, 2003.
- COWARD, W.A; WHITEHEAD, R.G. Changes in serum b-lipoprotein concentration during the development of kwashiorkor and in recovery. **Br. J. Nutr.** 27: 383-389, 1972.
- DÂMASO, A. **Nutrição e exercício na prevenção de doenças.** Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

- ENGELS, R.C; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanc in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Anal. Biochem.** 88: 475-484, 1978.
- GOLDEN, M.H.N; GOLDEN, B.E. Effect of zinc supplementation on the dietary intake, rate of weight gain, and energy cost of tissue deposition in children recovering from sever malnutrition. **Am. J. Clin. Nutr.** 34: 900-908, 1981.
- LATORRACA, M.Q; CARNEIRO, E.M; BOSCHERO, A.C; MELLO, M.A.R. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and early steps on insulin action in rats. **J. Nutr.** 128: 16432-1649, 1998.
- LATORRACA, M.Q; CARNEIRO, E.M; MELLO, M.A.R; BOSCHERO, A.C. Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with diminished calcium uptake. **J. Nutr. Biochem.** 10: 37-43, 1999.
- MELLO, M.A.R. Desnutrição protéico-calórica, gravidez e desenvolvimento materno: estudo comparativo de alterações corporais e metabólicas em ratas jovens e adultas. São Paulo; [Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo], 1985.
- MELLO, M.A.R; LUCIANO, E. Efeitos bioquímicos da ingestão de carboidrato líquido durante o exercício aeróbio em ratos recuperados de desnutrição. **Rev. Paran. de Educ. Fís.** 1(2): 7-14, 2000.
- MELLO, M.A.R; LUCIANO, E; CARNEIRO, E.M; LATORRACA, M.Q; OLIVEIRA, C.A.M; BOSCHERO, A.C. Glucose homeostasis in pregnant rats submitted to protein restriction. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol.** 113/114: 229-248, 2003.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Pesquisa nacional sobre demografia e saúde 1996: relatório preliminar.** Brasília: Ministério da Saúde, 1996.
- MONTEIRO, C.A. **A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil: implicações para políticas públicas.** Seminário Especial Fome e Pobreza, Rio de Janeiro, 2003.
- NGUYEN, T.D; KEAST, D. The effects of diet on the maximal activities of glutaminase, citrate synthase, hexokinase, 6-phosphofructokinase and lactate dehydrogenase in the skin of haired and hairless mice of various age. **Int. J. Biochem.** 23(3): 365-369, 1991.

- NOGUEIRA, D.M; STRUFALDI, B; HIRATA, M.H; ABDALA, D.S.P; HIRATA, R.D.C. **Métodos de bioquímica clínica**, São Paulo: Pancas Editorial, 1990.
- PAPOTI, M; ALMEIDA, P.B.L; PRADA, F.J.A; ELENO, T.G; HERMINI, H.A; GOBATTO, C.A. Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição protéica. **Motriz**. 9(2): 97-103, 2003.
- PENNEY, D; ANDERSON, D; DONGAS, J. Effects of early severe malnutrition on heart and skeletal muscle lactate dehydrogenase. **J. Nutr.** 106(9): 1235-1240, 1976.
- REEVES, P.G; NIELSEN, F.H; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition AdHoc Writing Committee on the Reformulation of AIN-76A. **J. Nutr.** 123: 1938-1951, 1993.
- SANTOS, M.A; ROSA, R; BARBOSA, L.M; VASCONCELOS, D.H.G.P. Effect of protein malnutrition on the glycolytic and glutaminolytic enzyme activity of rat thymus and mesenteric lymph nodes. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 30(6): 719-722, 1997.
- TEGTBUR, U; BUSSE, M.W; BRAUMANN, K.M. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 25: (5): 620-627, 1993.
- TORUN, B; CHEW, F. Protein energy malnutrition. In: Shils M, Olson JA, Shike M, editors. **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lea & Febiger. 950-76, 1994.
- VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 35: 1389-1394. 2002.

CAPÍTULO 4

VOLTARELLI, F.A; ARAÚJO, M.B; RIBEIRO, C; MOTA, C.S.A; MELLO, M.A.R. Spirulina como fonte de proteína na dieta para ratos em recuperação da desnutrição: efeitos sobre a proteína muscular e crescimento corporal. **Journal of Ethnopharmacology**, 2008 (*Artigo Original*) (Submetido).

Resumo

Introdução: *Spirulina* é uma alga verde-azulada de formato helicoidal cujo mérito especial como alimento é conter de 65 a 70% de proteína baseado no peso seco e possuir todos os oito aminoácidos essenciais para o homem, além de ser de baixo custo. **Objetivo:** O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da *Spirulina* como única fonte protéica sobre a proteína muscular e crescimento corporal de ratos em recuperação da desnutrição protéica. **Materiais e Métodos:** Ratos Wistar jovens (30 dias) foram separados em 5 grupos: I- Caseína 17% (C17; 30-150 dias de idade (d/i); II- *Spirulina* 17% (S17; 30-150 d/i); III- Caseína 6% (C6; 30-150 d/i); IV- Caseína 6% (30-90 d/i) and *Spirulina* 17% (91-150 d/i) (C6/S17) e V- Caseína 6% (30-90 d/i) e Caseína 17% (91-150 d/i) (C6/C17). Os conteúdos de proteína muscular total e DNA bem como as taxas de síntese e degradação protéicas foram investigadas visando inferir sobre o crescimento muscular e a proteína muscular, respectivamente. **Resultados:** O grupo submetido à desnutrição protéica (C6) apresentou conteúdos de proteína total e DNA no músculo sóleo reduzidos se comparado aos outros grupos. A recuperação nutricional, usando ambas as dietas, restabeleceu esses parâmetros. As dietas contendo caseína e *spirulina* reduziram as taxas de degradação protéica e aumentaram as taxas de síntese protéica no músculo sóleo de ratos previamente desnutridos. *Spirulina* provou ser uma adequada fonte de proteína na recuperação do ganho de peso corporal e da proteína muscular de ratos submetidos à desnutrição protéica.

Palavras-chaves: Proteína muscular; *Spirulina*; Ratos; Desnutrição protéica.

1- INTRODUÇÃO

Mesmo estando no século XXI, a desnutrição permanece sendo um importante fator que prejudica a saúde e a produção de grande número de pessoas. No Brasil, 30,7% das crianças com menos de 5 anos de idade são acometidas por algum tipo de desnutrição; na região sudeste, a prevalência da desnutrição está em torno de 21,7% (Ministério da Saúde, 1996).

Existem várias formas de desnutrição; marasmo e kwashiorkor são manifestações clínicas da desnutrição protéico-calórica severa. A desnutrição protéica causa efeitos deletérios em vários sistemas orgânicos, conduzindo a acentuados distúrbios metabólicos, os quais alteram o processamento dos alimentos quando a ingestão de alimentos se encerra. Assim, a prevalência por um período extenso da desnutrição protéico-calórica pode resultar em prejuízos para o crescimento bem como alterações fisiológicas (GALDINO et al., 2001).

Nos dias atuais, com a prevalência de proteínas de baixo valor biológico na alimentação em todo o mundo e a necessidade crescente e urgente de alimentos de baixo custo e bom valor nutricional, a exploração de biomassas como fonte de proteína alternativa na dieta tona-se de grande interesse. O uso de algas na alimentação humana é antigo. Em países orientais, em particular, fontes alternativas de alimento têm sido extensivamente investigadas com a esperança de corrigir principalmente a deficiência protéica que caracteriza o *status* nutricional de populações menos favorecidas (KAY, 1991; SIMPORE et al., 2006).

Spirulina é uma alga verde-azulada de forma helicoidal com comprimento de 0,2-0,3 mm (HADENSHOG; HOFSTEN, 1979; COSTA et al., 2006). O mérito especial da *spirulina* é que a mesma contém 65 - 70% de proteína baseado no seu peso seco, cujo valor é maior do que em qualquer outra fonte de alimento natural. Além disso, possui todos os oito aminoácidos essenciais para o homem (LI et al., 2006). Essa alga cresce, normalmente, em lagos naturais e alcalinos em zonas áridas. Embora a água de natureza alcalina desses lagos não possa ser usada para a irrigação, a mesma pode ser utilizada para a cultura de *spirulina* (KAY, 1991; SIMPORE et al., 2006). Uma vez que essa alga possui uma taxa de reprodução elevada, dividindo-se três vezes ao dia, uma área devotada totalmente ao cultivo de *spirulina* pode produzir 125 vezes mais proteína se comparada à uma área devotada para o cultivo do milho, 70 vezes mais

em relação à criação de peixes e 600 vezes mais quando comparada à criação extensiva de gado (FURST, 1978; BRANGER et al., 2003).

De acordo com avaliações prévias, a *spirulina* parece ser uma boa fonte alimentar de proteína para seres humanos. Essa alga possui aceitação adequada e parece não exercer efeitos tóxicos, embora apresente ligeira redução da digestibilidade (SAUTIER., TREMOLIERES, 1975; SIMPORE et al., 2005). Os estudos mais detalhados sobre o valor nutricional da *spirulina* têm sido conduzidos em roedores, principalmente ratos. Os estudos realizados com roedores englobam uma variedade de parâmetros, tais como o crescimento corporal (TRANQUILLE et al, 1994; SALAZAR et al, 1996), eficiência protéica e utilização em rede de proteína (NPU) (NARAYAN et al, 2005), maturação sexual (CONTRERAS et al, 1979), performance reprodutiva (SALAZAR et al, 1996), status hematológico (KAPOOR; METHA, 1998), toxicidade (CHEN; PAN, 2005), entre outros. *Spirulina* provou ser adequada no sentido de manter todos esses parâmetros fisiológicos em níveis normais e não produziu efeitos adversos após tratamento crônico.

De acordo com os conhecimentos dos autores, há pouca informação acerca dos efeitos da *spirulina* sobre os tecidos com elevadas taxas metabólicas, tais como o músculo esquelético, durante a recuperação da desnutrição protéica. O músculo esquelético é suscetível à desnutrição protéica e isso se deve ao fato de que o mesmo é um dos mais importantes estoques de proteína do organismo (ALVES et al., 2008). Portanto, quando há deficiência de proteína na dieta, esse tecido se torna alvo de depleção (NASCIMENTO et al, 1990; IHEMELANDU, 1995; OLIVEIRA et al, 1999). Assim, o presente estudo foi delineado para avaliar os efeitos da *spirulina*, como única fonte protéica na dieta, em ratos previamente submetidos à desnutrição, sobre o crescimento corporal e o metabolismo protéico muscular.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Animais

Todos os experimentos envolvendo animais, no presente estudo, seguiram tanto as resoluções específicas Brasileiras de Bioética de Experimentação Animal (lei nº 6.638 de 8 de Maio de 1979; Decreto nº 24.645 de 10 de Julho de 1934, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) como os princípios aceitos internacionalmente para o uso e cuidados com animais de laboratório, segundo as

normas da Comunidade Européia (Diretiva EEC de 1986; 86/609/EEC). Ratos Wistar jovens (30 dias de idade no início do experimento), pesando $119,5 \pm 12,7\text{g}$ e medindo (comprimento focinho-ânus) $19,1 \pm 1,2\text{cm}$, obtidos a partir das facilidades de obtenção de animais da UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil, foram utilizados.

2.2- Dietas

Dietas semi-purificadas, contendo 17% de proteína representada pela caseína (dieta de proteína livre em pó adicionada de caseína – proteína do leite em pó), 6% de proteína representada pela caseína e 17% de proteína representada pela *spirulina* (dieta de proteína livre em pó adicionada de *spirulina* – *Spirulina maxima* em pó vendida comercialmente pela All Chemistry do Brasil Ltda.), como descritas na Tabela 1, foram utilizadas.

Tabela 1: Composição das dietas (g/kg)

Componentes	Caseína 17%*	<i>Spirulina</i> 17%	Caseína 6%**
<i>Spirulina</i> (65% proteína)***	-	280,0	-
Casein (84% proteína)****	202,2	-	71,5
Amido de milho	397,0	386,0	480,0
Dextrina	130,5	130,5	159,0
Sacarose	100,0	100,0	121,0
Óleo de soja	70,0	70,0	70,0
Fibra Alimentar (microcelulose)	50,0	50,0	50,0
Mistura de vitaminas	35,0	35,0	35,0
Mistura de minerais	10,0	10,0	10,0
L-cistina	3,0	3,0	3,0
Colina	2,5	2,5	2,5

* De acordo com a dieta para fase de crescimento, período de gestação e lactação de roedores – AIN – 93G (Reeves et al, 1993)

** Dieta para indução da desnutrição protéica (Latorraca et al, 1998)

*** Valores corrigidos para o conteúdo de proteína em *spirulina* (Albanese and Orto, 1963)

**** Valores corrigidos para o conteúdo de proteína em caseína (Albanese and Orto, 1963)

A composição da *spirulina* em pó foi a seguinte: Análise Geral (%): proteína 64,7; carboidratos 15; lipídios 6; minerais (cinza) 7; fibra 8; Minerais (mg/10g): cálcio 70; ferro 15; fósforo 80; magnésio 40; zinco 0,3; manganês 0,5; sódio 90; potássio 140; minerais (mcg/10g): selênio 10; cobre 120; cromo 25. Vitaminas (por 10g): vitamina A 23000UI, beta-caroteno 14mg; vitamina D 1200UI; vitamina E 1,0 mg; vitamina K 200 mcg; biotina 0,5 mcg; inositol 6,4 mg; tiamina 0,35 mg; riboflavina 0,4 mg; niacina 1,4 mg; piridoxina 80 mcg; folato 1,0 mcg; cianocobalamina 20 mcg; ácido pantotênico 10 mcg. Aminoácidos essenciais (mg/10g): isoleucina 350; leucina 540; lisina 290; metionina 140; fenilalanina 280; treonina 320; triptofano 90; valina 400. Aminoácidos não-essenciais (mg/10g): alanina 470; arginina 430; ácido aspártico 619; cistina 60; ácido glutâmico 910; glicina 320; histidina 100; prolina 270; serina 320; tirosina 300. Aminoácidos totais (g/10g): 6,2.

2.3- Delineamento e Grupos Experimentais

Ratos Wistar jovens (30 dias de idade no início do experimento) e machos foram separados em 5 grupos (n=8/grupo), de acordo com a dieta recebida durante o experimento:

- I- Caseína 17% (C17) dos 30 aos 150 dias de idade;
- II- Spirulina 17% (S17) dos 30 aos 150 dias de idade;
- III- Caseína 6% (C6) dos 30 aos 150 dias de idade;
- IV- Caseína 6% dos 30 aos 90 dias e Spirulina 17% dos 91 aos 150 dias de idade (C6/S17);
- V- Caseína 6% dos 30 aos 90 dias e Caseína 17% dos 91 aos 150 dias de idade (C6/C17).

Durante o experimento, os ratos tiveram livre acesso ao alimento e à água e foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola), sob ciclo claro-escuro de 12 horas, na temperatura de 25°C. A ingestão alimentar foi monitorada diariamente e peso e comprimento corporais foram registrados uma vez por semana. Além disso, as razões de eficiência alimentar (ganho de peso corporal [g] / ingestão [g] e eficiência protéica (ganho de peso corporal [g] / ingestão de proteína [g]) foram calculadas.

2.4- Extração Tecidual

Ao final do período experimental, todos os animais foram sacrificados por decapitação. Amostras de sangue foram coletadas para as mensurações séricas de glicose, proteínas totais, albumina e ácidos graxos livres (AGL) (NOGUEIRA et al., 1990). Amostras do tecido hepático foram coletadas para as determinações de lipídios totais (NOGUEIRA et al., 1990) e glicogênio (SIU LO; TAYLOR, 1970). O músculo sóleo esquerdo foi fatiado, pesado e analisado quanto aos conteúdos de proteína total (LOWRY et al., 1951) e DNA (GILES; MEYERS., 1961) e à razão proteína /DNA, para inferir sobre o crescimento muscular. Fatias longitudinais (70mg) do músculo sóleo direito dos animais foram excisadas a determinação das taxas de síntese e degradação protéicas. Fatias do músculo gastrocnêmio direito (100-200mg) foram coletadas para a determinação da atividade da enzima fosfatase alcalina.

2.5- Síntese Protéica

Fatias longitudinais (70mg) musculares foram pré-incubadas por 30 minutos em meio RPMI-1640 (com glutamina e sem fenol vermelho e bicarbonato de sódio), suplementado com albumina sérica bovina desengordurada (BSA) [0,1%] e insulina [100u/ml] e saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio RPMI com a mesma suplementação, contendo ¹⁴C fenilalanina [0,05 uCi/ml] e incubadas por 2 horas. Ao final da incubação, as fatias musculares foram homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) 5% e centrifugadas a 2000rpm por 15 minutos a 4°C. O material TCA-insolúvel foi lavado 3 vezes com TCA 5%. O precipitado resultante foi dissolvido em SDS 10%, à temperatura ambiente por 30 minutos, para a determinação do conteúdo protéico e da radioatividade incorporada às proteínas musculares. O conteúdo de proteína muscular foi determinado pelo método folin fenol (LOWRY et al, 1951) e a radioatividade incorporada à proteína muscular foi medida com o auxílio de um cintilador. A síntese protéica foi calculada dividindo-se a radioatividade incorporada pela radioatividade específica da fenilalanina no meio de incubação e expressa como nanomoles de fenilalanina por miligrama de proteína por 2 horas.

2.6- Degradação Protéica

A liberação de tirosina pelo músculo isolado na presença de ciclohexamida foi utilizada como índice da degradação protéica, conforme descrito previamente por FULKS et al. (1975). Este método vale-se do fato de que o aminoácido tirosina não é sintetizado nem degradado pelo músculo esquelético. Fatias longitudinais musculares (70mg) foram pré-incubadas em tampão Krebs-Ringer [NaCl 1,2 mmol/L; KCl 4,8 mmol/L; NaHCO₃ 25 mmol/L; CaCl₂ 2,5 mmol/L; KH₂PO₄ 1,2 mmol/L e MgSO₄ 1,2 mmol/L – pH 7,4] suplementado com glicose [5,5 mmol/L], BSA [1,34%], insulina [5u/ml] e ciclohexamida [5,0 mmol/L], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio de mesma composição e incubada por 2 horas. Ao final da incubação, amostras do meio de incubação foram utilizadas para determinação do teor de tirosina pelo procedimento de WAALKES & UDENFRIEND (1957).

2.7- Fosfatase Alcalina Muscular

O papel fisiológico da enzima fosfatase alcalina (FA) pode ser associada ao transporte e à atividade celular (CALHAU et al., 1999). Por essa razão, a atividade dessa enzima foi mensurada no tecido muscular dos animais. Fatias do músculo gastrocnêmio (100-200mg) foram obtidas e homogeneizadas por sonicação durante 40 segundos em 500µl de água destilada. O homogeneizado foi centrifugado a 2000rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi então separado visando-se mensurar a atividade da fosfatase alcalina pelo método colorimétrico (Labtest® kit).

2.8- Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± Desvio Padrão para o número de ratos (n) indicado. Nas avaliações das taxas de síntese e de degradação protéicas bem como da atividade da enzima FA, o n indicou o número de fatias musculares. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA de duas entradas, seguido de Bonferroni *post-hoc* teste, e o nível de significância foi pré-estabelecido em 5% para indicar possíveis diferenças entre os grupos.

3- Resultados

Peso e comprimento corporais, assim como as concentrações séricas de proteína, albumina e AGL foram menores no grupo submetido à desnutrição protéica (C6) quando comparado aos grupos alimentados com quantidade normal de proteína (C17 e S17) e aos grupos recuperados da desnutrição protéica (C6/C17 e C6/S17). Por outro lado, as concentrações de lipídio total foram mais elevadas e as concentrações de glicogênio, menores no grupo desnutrido (C6) se comparado aos demais grupos. Não foram observadas diferenças em relação à ingestão alimentar e à eficiência protéica quando todos os grupos foram comparados, no entanto a eficiência alimentar foi menor no grupo submetido à desnutrição protéica (C6) se comparado aos outros grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Ganhos de peso (g) e comprimento (cm) corporais; ingestão alimentar (g / 100 g de peso corporal); razões de eficiência alimentar (ganho de peso corporal [g] / ingestão [g]) e de eficiência protéica (ganho de peso corporal [g] / ingestão de proteína [g]); concentrações séricas de proteína (g/dL), albumina (g/dL) e AGL ($\mu\text{Eq/L}$) e conteúdos de lipídios totais (mg/100mg) e glicogênio (mg/100mg) do tecido hepático dos animais ao final do experimento.

Parâmetros	Grupos				
	C17	S17	C6	C6/C17	C6/S17
Ganho de peso corporal	438,4± 22,1	436,9± 39,1	233,1±* 31,9	434,9± 32,8	435,3± 25,3
Ganho em comprimento corporal	11,7± 0,4	11,9± 0,4	7,2±* 0,4	11,3± 0,3	11,2± 0,2
Ingestão alimentar	12,6± 0,9	12,0± 0,5	12,5± 0,8	11,1± 0,7	11,6± 0,5
Eficiência alimentar	5,3± 0,3	5,1± 0,5	2,2±* 0,3	5,2± 0,4	5,0± 0,3
Eficiência protéica	3,4± 0,4	3,4± 0,5	3,3± 0,3	3,2± 0,4	3,3± 0,2
Proteína sérica	7,5± 0,2	7,4± 0,3	4,5±* 0,3	7,3± 0,2	7,5± 0,4
Albumina sérica	7,4± 0,4	7,5± 0,5	3,8±* 0,4	7,6± 0,5	7,8± 0,3
AGL sérico	382,5± 12,1	379,9± 8,3	170,0±* 19,2	386,4± 10,0	381,0± 7,4
Lipídios totais hepático	4,4± 0,5	4,5± 0,5	12,0±* 1,2	4,6± 0,4	4,3± 0,3
Glicogênio hepático	7,2± 0,2	7,3± 0,3	5,7±* 0,5	7,2± 0,4	7,0± 0,3

Resultados expressos como média \pm DP de 8 ratos por grupo;

C17= Dieta Caseína 17% 16 semanas; S17= Dieta *Spirulina* 17% 16 semanas; C6= Dieta Caseína 6% 16 semanas; C6/C17= Dieta Caseína 6% 8 semanas e Dieta Caseína 17% 8 semanas; C6/S17 = Dieta Caseína 6% 8 semanas e Dieta *Spirulina* 17% 8 semanas;

* Significativamente diferente ($p < 0,05$, ANOVA de duas entradas) dos demais grupos.

Os conteúdos de proteína total e DNA bem como a razão proteína/DNA no músculo sóleo mostraram-se diminuídos nos animais submetidos à restrição protéica (C6). Estes efeitos foram revertidos pela re-alimentação utilizando-se as dietas balanceadas contendo *spirulina* e caseína durante 8 semanas, uma vez que os resultados

observados para os grupos recuperados (C6/C17 e C6/S17) foram similares aqueles obtidos pelos grupos alimentados com a dieta contendo quantidade adequada de proteína (C17 e S17) (Tabela 3). As taxas de síntese protéica diminuíram significativamente ao passo que as taxas de degradação protéica se elevaram no grupo deficiente em proteína (C6) quando comparado aos demais grupos (Figura 1 A e B). Após 8 semanas de tratamento com a dieta balanceada contendo caseína ou *spirulina*, as taxas de síntese protéica (Figura 1A) foram restabelecidas nos grupos recuperados (C6/C17 e C6/S17) se comparados aos grupos controles (C17 e S17). O mesmo foi observado em relação às taxas de degradação protéica (Figura 1B).

A atividade da enzima fosfatase alcalina no músculo gastrocnêmio dos animais deficientes em proteína na dieta (C6) foi maior se comparada aos demais grupos (Figura 2).

Table 3. Conteúdos de proteína (g/100g) e DNA (g/100g) e razão proteína/DNA no músculo sóelo dos animais ao final do experimento.

Parâmetros	Grupos				
	C17	S17	C6	C6/C17	C6/S17
Proteína	3,5± 0,3	3,5± 0,4	1,4±* 0,2	3,2± 0,2	3,1± 0,3
DNA	0,148± 0,012	0,147± 0,009	0,139±* 0,014	0,145± 0,013	0,149± 0,014
Proteína/DNA	23,9± 3,2	24,0± 3,5	10,2±* 2,4	21,9± 2,3	22,4± 3,1

Resultados expressos como média ± DP de 8 ratos por grupo;

C17= Dieta Caseína 17% 16 semanas; S17= Dieta *Spirulina* 17% 16 semanas; C6= Dieta Caseína 6% 16 semanas; C6/C17= Dieta Caseína 6% 8 semanas e Dieta Caseína 17% 8 semanas; C6/S17 = Dieta Caseína 6% 8 semanas e Dieta *Spirulina* 17% 8 semanas;

* Significativamente diferente ($p < 0,05$, ANOVA de duas entradas) dos demais grupos.

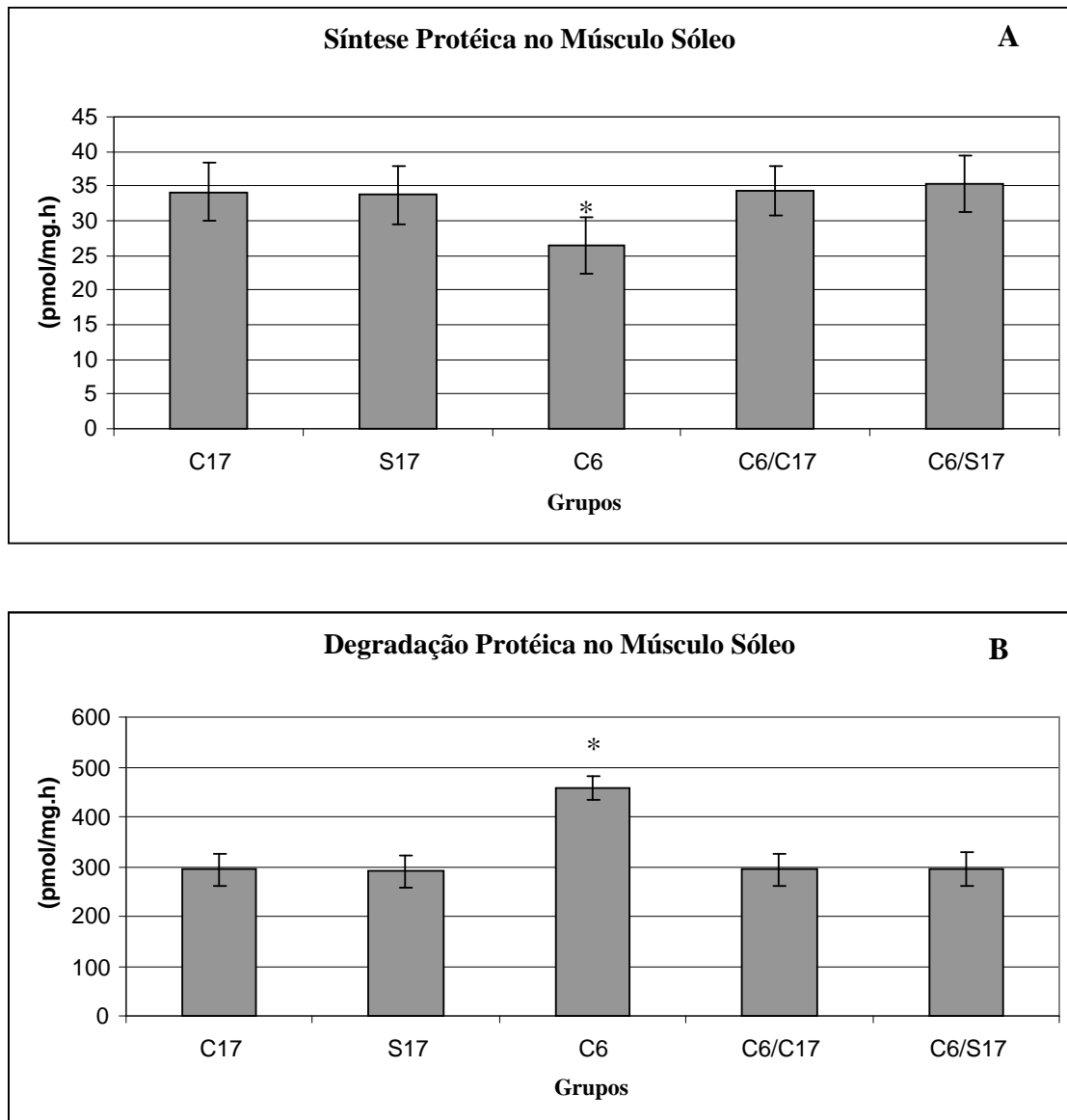


Figura 1: Taxas de síntese (pmo/mg.h) (A) e degradação (pmo/mg.h) (B) protéicas no músculo sóleo dos animais (n=8/grupo) ao final do experimento.

C17= Dieta Caseína 17% 16 semanas; S17= Dieta *Spirulina* 17% 16 semanas; C6= Dieta Caseína 6% 16 semanas; C6/C17= Dieta Caseína 6% 8 semanas e Dieta Caseína 17% 8 semanas; C6/S17 = Dieta Caseína 6% 8 semanas e Dieta *Spirulina* 17% 8 semanas;

* Significativamente diferente ($p < 0,05$, ANOVA de duas entradas) dos demais grupos.

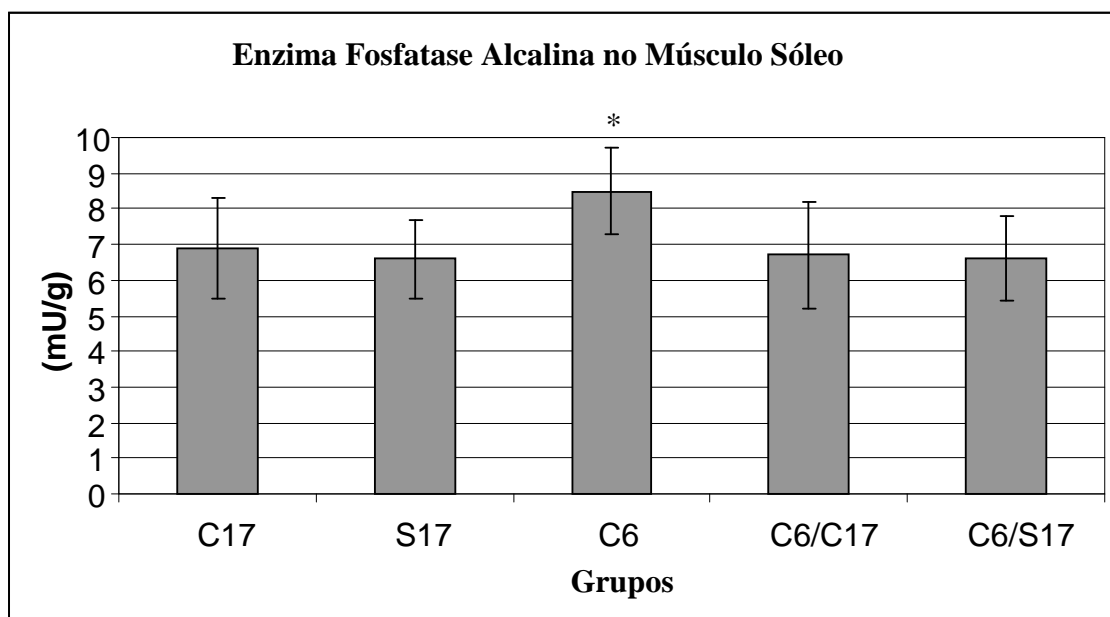


Figura 2: Atividade da enzima fosfatase alcalina no músculo sóleo dos animais (n=8/grupo) ao final do experimento.

C17= Dieta Caseína 17% 16 semanas; S17= Dieta *Spirulina* 17% 16 semanas; C6= Dieta Caseína 6% 16 semanas; C6/C17= Dieta Caseína 6% 8 semanas e Dieta Caseína 17% 8 semanas; C6/S17 = Dieta Caseína 6% 8 semanas e Dieta *Spirulina* 17% 8 semanas;

* Significativamente diferente ($p < 0,05$, ANOVA de duas entradas) dos demais grupos.

4- Discussão

Embora a prevalência da desnutrição esteja decrescendo no Brasil, não há uma única região onde o déficit de estatura de crianças com menos de 5 anos de idade se encontre completamente superado. A proposta de se alcançar valores de referência de crescimento corporal (Tabela do Centro Nacional de Estatística da Saúde – CNES – recomendada universalmente) está quase completa em algumas regiões, mas não em todas (MONTEIRO, 2003). Em algumas áreas, a deficiência protéica ainda é prevalente e pode aumentar a incidência da instalação do Kwashiorkor (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003). Assim, há um grande interesse em se desenvolver procedimentos mais efetivos para o tratamento da desnutrição protéica. Isto inclui o emprego de novas fontes de proteína na dieta, como por exemplo a alga verde-azulada chamada *spirulina*, afim de evitar e/ou recuperar da desnutrição. *Spirulina* demonstrou ser eficiente tanto em atenuar a hipertensão em ratos (HERNÁNDEZ et al., 2001) como no tratamento de algumas doenças, tais como o câncer (NAGASAWA et al., 1989), desnutrição (FICA et al., 1984; SIMPORE et al., 2006) e AIDS (SIMPORE et al., 2005). No presente estudo,

nós verificamos os efeitos dessa alga sobre o metabolismo protéico muscular bem como sobre o crescimento corporal de ratos jovens previamente submetidos à restrição protéica na dieta.

O *status* nutricional de animais alimentados com caseína (6% ou 17%) ou *spirulina* (17%) foi acessado por meio das mensurações de peso e comprimento corporais bem como pelos níveis séricos de proteína total e albumina, os quais são parâmetros nutricionais tradicionais usados para seres humanos e também frequentemente utilizados em estudos com animais (PRADA et al., 2001; MELLO et al., 2003).

Inúmeros estudos têm demonstrado que o crescimento corporal reduzido, em presença de albumina sérica diminuída, é frequentemente associado a complicações medicas (JEEJEEBHOY, 2000), incluindo a desnutrição protéica (LATORRACA et al., 1998). Ganhos no crescimento e comprimento corporais prejudicados, hipoalbuminemia, hipoproteinemia e conteúdos elevados de lipídios e glicogênio hepáticos, como observado em nossos animais experimentais mantidos com uma dieta pobre em proteína, são características comumente encontradas no Kwashiorkor infantil (TORUM; CHEW, 1994) e em animais acometidos pela desnutrição protéica (ALMEIDA; MELLO, 2004). Isto indica a adequação do modelo animal de desnutrição protéica usado no presente trabalho.

Como não houve diferença significativa na ingestão alimentar e na razão de eficiência protéica (EP) entre os ratos alimentados com as dietas contendo valores normais (C17) e restringidos (C6) de caseína, o modelo representa a deficiência protéica e não a deficiência energético-protéica (ENNOURI et al., 2006). Por outro lado, a razão de eficiência alimentar (EA) mostrou-se menor no grupo submetido à desnutrição protéica (C6) em relação aos animais pertencentes aos grupos C17 e S17.

A concentração sérica de AGL observada nos ratos pertencentes ao grupo C6, do presente estudo, foi significativamente menor em relação aos animais alimentados com a quantidade normal de proteína (C17 e S17). Isto confirma resultados prévios obtidos pelo nosso grupo (ALMEIDA; MELLO, 2004). Estudos usando animais experimentais mostraram que 6-desaturase, uma enzima chave na síntese de AG, apareceu inibida em jejum e em deficiências relacionadas à insulina, proteína e zinco, condições frequentemente observadas em crianças desnutridas (GOLDEN; GOLDEN, 1981).

Em relação ao conteúdo de lipídio hepático, houve aumento significativo nos ratos pertencentes ao grupo desnutrido (C6) quando comparado aos grupos C17 e S17. Isto confirma resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (MELLO, 1995; ALMEIDA; MELLO, 2004) e parece ocorrer como consequência da deficiência no transporte de lipídios para o exterior do fígado em organismos deficientes em proteína (COWARD et al., 1972).

Os ganhos de peso e comprimento corporais, as concentrações séricas de proteína, albumina e AGL bem como os conteúdos de lipídio e glicogênio hepáticos foram restabelecidos pelas dietas balanceadas contendo tanto caseína como *spirulina* nos grupos recuperados (C6/C17 e C6/S17). Os efeitos positivos da *spirulina* como fonte protéica, similares aqueles obtidos com a caseína, para a recuperação da desnutrição protéica, foram também observados por nós em estudo prévio utilizando animais adultos (ALVES et al., 2005), reforçando o valor nutricional dessa alga.

De acordo com WINICK et al. (1972), o número total de células em um órgão pode ser estimado pela determinação do conteúdo total de DNA, ao passo que o tamanho celular pode ser estimado pelo cálculo das razões peso do tecido/DNA ou proteína/DNA (WINICK et al., 1972). Alterações nutricionais, durante o período de crescimento hiperplásico e/ou hipertrófico, podem resultar em número e/ou tamanho de células alterado nesse tecido. Estudos acerca do tamanho do músculo de animais submetidos à desnutrição pós-natal têm revelado que essa redução é primariamente atribuída à redução no volume das fibras (hipotrofia) em detrimento à redução do número total de fibra nesse tecido (hipoplasia) (ROWE, 1968; STICHLAND et al., 1975). Portanto, no presente estudo, os conteúdos de proteína total e DNA bem como a razão proteína/DNA no músculo sóleo foram diminuídos nos animais previamente submetidos à desnutrição protéica se comparados aos grupos C17 e S17, sugerindo tanto hipoplasia como hipotrofia da musculatura esquelética. Esta situação foi revertida nos grupos C6/C17 e C6/S17 ao final do experimento, indicando que a *spirulina* como única fonte de proteína na dieta mostrou-se adequada no sentido de promover crescimento hiperplásico e hipertrófico na musculatura esquelética de ratos jovens submetidos à restrição protéica.

Para análise das consequências da desnutrição protéica seguida de um período de recuperação nutricional por meio da ingestão de dietas contendo caseína e *spirulina*, sobre o metabolismo protéico muscular, as taxas de síntese e degradação

protéicas do músculo sóleo dos animais foram avaliadas *in vitro*. Após 16 semanas de tratamento com dietas experimentais, sendo 8 semanas de restrição protéica, seguidas de 8 semanas de recuperação nutricional, as taxas de síntese protéica, as quais foram reduzidas pela restrição de proteína na dieta, foram restabelecidas pelas dietas balanceadas contendo valores normais de proteína na forma tanto de caseína como *spirulina*. Ao final do experimento, quando analisados os grupos C6/C17 e C6/S17 e comparados aos grupos C17 e S17, não foram observadas diferenças nos valores de síntese protéica obtidos. O mesmo foi observado em relação à degradação protéica, isto é, essas taxas, as quais foram elevadas devido à restrição inicial de proteína, retornaram a valores similares aos dos grupos C17 e S17 ao final do experimento. Não foram encontradas diferenças nas taxas de síntese e degradação protéicas quando comparados os grupos alimentados com quantidades normais de proteína na dieta (C17 e S17).

A enzima fosfatase alcalina (FA) pertence a um grupo heterogêneo de enzimas que são extensamente distribuídas em células de mamíferos. Elas são associadas, frequentemente, às membranas celulares, mas sua função fisiológica exata não foi totalmente elucidada. Apesar disso, FA é uma importante indicadora bioquímica sérica de patologias hepáticas. Portanto, aumento na atividade de FA em certos tecidos pode refletir em alterações fisiológicas ou patológicas além daquelas originadas no tecido hepático. Por exemplo, aumentos não-hepáticos na atividade da FA tecidual foram observados em animais jovens, em fêmeas prenhas e em período de aleitamento e em associação com dietas ricas em gordura e/ou deficientes em proteína (FERNANDEZ; KIDNEY, 2007). Além disso, a determinação da FA no tecido muscular é uma ferramenta útil para estimar a atividade celular nesse tecido (CALHAU et al., 1999). No presente estudo, a atividade da FA foi maior no músculo sóleo dos animais desnutridos (C6) quando comparados aos grupos que receberam dieta contendo valores normais de proteína (C17 e S17). Hipotetiza-se que tal aumento poderia ser consequência, pelo menos em parte, do desbalanço do turnover protéico nesse tecido, o qual pode ter sido induzido pela restrição de proteína na dieta. Por outro lado, os ratos recuperados da desnutrição (C6/C17 e C6/S17) tiveram seus níveis musculares de FA restaurados, quando comparados aos grupos C17 e S17, concomitantemente com o aumento das taxas de síntese e diminuição das taxas de degradação protéicas nesse tecido.

Em síntese, a *spirulina* provou ser uma adequada fonte de proteína na dieta no sentido de recuperar os ganhos de peso e comprimento corporais em animais submetidos à desnutrição protéica. Além disso, síntese protéica muscular bem como os conteúdos de proteína total e DNA foram aumentados por meio da ingestão de ambas as dietas experimentais em animais jovens e desnutridos.

5- Conclusões

Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que:

- Ratos submetidos à restrição protéica na dieta mostraram atraso do crescimento corporal e perda de proteína muscular;
- Alimentar ratos previamente submetidos à restrição protéica com dietas balanceadas contendo caseína ou spirulina mostrou ser eficiente em reverter as alterações no crescimento muscular e no metabolismo protéico induzidas pela restrição protéica;
- Ambas as dietas provaram ser eficientes nesse sentido. Esse fato demonstra o potencial valor da proteína originária da alga na recuperação da desnutrição protéica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo suporte financeiro.

6- Referências Bibliográficas

- ALBANESE, A.A; ORTO, L.A. Protein and amino acids. In: Albanese, A.A. ed. **Newer methods of nutritional biochemistry**. N.Y., Academic Press, v. I. cap. 1, 84, 1963.
- ALMEIDA, P.B.L; MELLO, M.A.R. Desnutrição protéica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.** 18(1): 17-30, 2004.
- ALVES, A.P; DÂMASO, A.R; DAL PAI, V. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **J. Pediatric** (Rio J) 84(3): 264-271, 2008.

- ALVES, C.R; VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R. *Spirulina* como fonte protéica na recuperação de ratos desnutridos: efeitos sobre o músculo esquelético. **EF Dep.** 86: 1-7, 2005.
- BATISTA FILHO, M; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. Saúde Públ.** 19(1): 5181-5191, 2003.
- BRANGER, B; CADUDAL, J.L; DELOBEL, M; OUOBA, H; YAMEOGO, P; OUEDRAOGO, D. 2003. *Spiruline* as a food supplement in case of infant malnutrition in Burkina-Faso. **Arch Pediatric.** 10(5): 424-431, 2003.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Pesquisa Nacional Sobre demografia e Saúde.** Relatório preliminar, Brasília, p. 182, 1996.
- CALHAU, C; HIPÓLITO, R.C; AZEVEDO, I. Alkaline phosphatase and exchange surfaces. **Clin Bioch.** 32 (2): 153-154, 1999.
- CHEN, H; PAN, S.S. Bioremediation potential of *Spirulina*: toxicity and biosorption studies of lead. **J Zhe Univ Sci B.** 6(3): 171-174, 2005.
- CONTRERAS, A; HERBERT, D.C; GRUBS, B.G; CAMERON, I.L. Blue alga *Spirulina* as the sole dietary source of protein in sexually maturing rats. **Nutr Reprod Inter** 19(6): 749-763, 1979.
- COSTA, D.A; DE MORAIS, M.G; DALCATON, F; REICHERT, C; DURANTE, A.J. Simultaneous cultivation of *Spirulina* plantesis and the toxigenic cyanobacteria *microcystis aeruginosa*. **Naturforsch.** 61(1-2): 105-110, 2006.
- COWARD, W.A; WHITEHEAD, R.G. Changes in serum b-lipoprotein concentration during the development of kwashiorkor and in recovery. **British J Nutr.** 27: 383-389, 1972.
- ENNOURI, M; FETOUI, H; BOURRET, E; ZEGHAL, N; GUERMAZI, F; ATTIA, H. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 2. Influence of seed supplemented diet on rats. **Biores Tech.** 97: 2136-2140, 2006.
- FERNANDEZ, N.J; KIDNEY, B.A. Alkaline Phosphatase: beyond the liver. **Vet Clinl Pathol.** 36(3): 223-233, 2007.
- FICA, V; OLTEANU, D; OPRESCU, S. Use of *Spirulina* as an adjuvant nutrient factor in the therapy of the diseases accompanying a nutritional deficiency. **Medicină internă.** 36: 225-234, 1984.

- FULKS, R.M; LI, JB; GOLDBERG, J.L. Effects of insulin, glucose, amino acids on protein turnover in rat diaphragm. **J Biol Chem.** 250: 290-298, 1975.
- FURST, P.T. *Spirulina*- Nutritious alga, once a staple of Aztec diets could feed many of the world's hungry people. **Human Nat.** 3: 60-71, 1978.
- GALDINO, R.S; MELLO, M.A.R; ALMEIDA, R.L; ALMEIDA, C.C.S. Desnutrição protéico-calórica. In Dâmaso A. (ed) **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**, Rio de Janeiro, MEDSI., pp. 35-46, 2001.
- GILES, A; MEYERS, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. **Nature** 206 (1 n. 4975): 93, 1961.
- GOLDEN, M.H.N; GOLDEN, B.E. Effect of zinc supplementation on the dietary intake, rate of weight gain, and energy cost of tissue deposition in children recovering from severe malnutrition. **Am J Clin Nutr.** 34: 900-908, 1981.
- HADENSHOG, G; HOFSTEN, A. The ultra structure of *Spirulina plantensis*. A new source of microbial protein. **Physiol Plant.** 23: 209-216, 1979.
- HERNÁNDEZ, A.R; CASTILLO, J.L.B; OROPEZA, M.A.J; ZAGOYA, J.C.D. *Spirulina maximum* prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. **Life Sci.** 69: 1029-1037, 2001.
- IHMELANDU, E.C. Fibre number and sizes of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition. **Acta Anat (Basel).** 121: 89-93, 1985.
- JEEJEEBHOY, K.N. Nutritional assessment. **Nutrition.** 16(7/8): 585-590, 2000.
- KAPOOR, R; METHA, U. Supplementary effect of *Spirulina* on hematological status of rats during pregnancy and lactation. **Plant Foods Human Nutr Alim.** 29(6): 517-534, 1998.
- KAY, R.A. 1991. Micro algae as food and supplement. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 30(6): 555-573, 1991.
- LATORRACA, M.Q; REIS, M.B; CARNEIRO, E.M; MELLO, M.A.R.; VELLOSO, L.A; SAAD, M.J; BOSCHERO, A.C. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and early steps of insulin action in rats. **J Nutr.** 128: 1643-1649, 1998.
- LI, Z.Y; GUO, S.Y; LI, L; CAI, M.Y. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina plantensis* in an air-lift photobioreactor. **Biores Tech.** 98(3): 700-705, 2006.

- LOWRY, O.H; ROSEBROUG, N.J; FARR, A.L; RANDALL, R.T. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J Biol Chem.** 193, 265-275, 1951.
- MELLO, M.A.R; LUCIANO. E; CARNEIRO, E.M; LATORRACA, M.Q; OLIVEIRA, C.A.M; BOSCHERO, A.C. Glucose homeostasis in pregnant rats submitted to dietary protein restriction. **Res Comm Mol Pathol Pharmacol.** 113-114: 229-246, 2003.
- MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil: implicações para políticas públicas. **Sem Esp Fome e Pobr**, Rio de Janeiro, 2003.
- NAGASAWA, H; KONISHI, R; SENSUI, N; YAMAMOTO, K; BEN-AMOTZ, A. An inhibition by beta carotene rich algae *Dunaliella* of spontaneous mammary tumourigenesis in mice. **Antican Res.** 9: 71-82, 1989.
- NARAYAN, M.S; MANOJ, G.P; VATCHRAVELO, K; BHAGRALAKSHMI, N; MAHADEVASWAMY, M. Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina plantesis*. **Int J Food and Scie Nutr.** 56(7): 521-528, 2005.
- NASCIMENTO, O.J; MADI, K; GUEDES E SILVA, J.B; SOARES FILHO, P.J; HAHN, M.D; COUTO, B. Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição protéica. **Arq Neuropsq.** 48: 395-402, 1990.
- NOGUEIRA, D.M; STRUFALDI, B; HIRATA, M; ABDALLA, D.S; HIRATA, R.D. (Eds) **Métodos de Bioquímica Clínica**, São Paulo, Pancas Editorial, 1990.
- OLIVEIRA, F.L; OLIVEIRA, A.S; SCHIMIDT, B; AMÂNCIO, O.M. Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1ª e 2ª gerações. **J Pediatric (Rio J).** 75: 350-356, 1999.
- PRADA, F.J; LUCIANO, E; CARNEIRO, E.M; BOSCHERO, A.C; MELLO, M.A.R. 2001. Protein deficiency attenuates the effects of alloxan on insulin secretion on glucose homeostasis in rats. **Physiol Chem Physiol Med NMR.** 33: 73-82, 2001.
- REEVES, P.G; NIELSEN, F.H; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final reports of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J Nutr.** 123: 1939-1951, 1993.

- ROWE, R.W.D. Effect of low nutrition on size of striated muscle fibers in the mouse. **J Exper Zoo.** 167: 353-358, 1968.
- SALAZAR, M; CHAMORRO, G.A; SALAZAR, S; STEELE, C.E. Effects of *Spirulina* maxima consumption on reproduction and peri and post natal development in rats. **Food Chem Toxicol.** 34(4): 353-359, 1996.
- SAUTIER, C; TREMOLIERES, J. Food value of the *Spirulina* algae to man. **Annals Nutr Alim.** 29(6): 517-534, 1975.
- SIMPORE, J; KABORE, F; ZONGO, F; DANSOU, D; BERE A. Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing *Spirulina* and misola. **Nutr J.** 23(5): 3-9, 2006.
- SIMPORE, J; ZONGO, F; KABORE, F; DANSOU, D; BERE, A; NIKIEMA, J.B; PIGNATELLI, S; BIONDI, D.M; RUBERTO, G; MUSUMECIS, S. Nutrition rehabilitation of HIV-infected and HIV-negative undernourished children utilizing *Spirulina*. **Annals Nutr Met.** 49(6): 373-380, 2005.
- SIU LO, J.C.R; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J Appl Physiol.** 8(2): 123-130, 1970.
- STICKLAND, N.C; WIDDOWSON, E.M; GOLDSPINK, G. Effects of severe energy and protein deficiencies on the fibers and nuclei in skeletal muscle of pigs. **British J Nutr.** 34: 421-428, 1975.
- TORUN, B; CHEW, F. Protein energy malnutrition. **Mod Nutr Health Dis.** 2: 950-976, 1994.
- TRANQUILLE, N; EMEIS, J.J; CHAMBURE, D; BINOT, R; TAMPONNET, C. *Spirulina* acceptability trials in rats. A study for the “Melissa” life-support system. **Adv Space Res.** 14 (11): 167-170, 1994.
- VOLTARELLI, F.A; MARCONDES, M.C.G; VOLTARELLI, V.A; RIBEIRO, C.; MOTA, C.S.A; STEVANATO, E; MELLO, M.A.R. Muscle protein in growing rats fed *Spirulina* as the sole dietary protein source. **Med Sci Sports Exer.** 40: S101-S102, 2008.
- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; MARCONDES, M.C.C.G. *Spirulina* protein, body growth, and skeletal muscle protein metabolism in young rats. **Amino Acids.** 35: 150, 2003.

- WAALKES, T.P; UDENFRIEND, S. Tyrosine in plasma and tissues. **J Lab Clin Med.** 50(5): 733-736, 1957.
- WINICK, M; BASEL, J.A; ROSSO, P. A Nutrition and cell growth. In: Winick M. **Nutrition and development.** John Wiley & Sons, New York, pp. 49-97, 1972.

8- COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES GERAIS

O primeiro estudo (**Capítulo 2**), apresentado na presente Tese de Doutorado, teve como objetivo avaliar os efeitos da *spirulina*, como única fonte de proteína na dieta, sobre o metabolismo protéico no músculo esquelético de ratos jovens. Esse estudo valeu-se da informação de que, além da agricultura e da pecuária convencionais, outras fontes protéicas têm sido examinadas. Nesse sentido, microorganismos têm recebido atenção especial como fonte alternativa de proteína na dieta. Entre vários organismos que vêm sendo estudados, a alga verde-azulada *spirulina* é considerada um microorganismo promissor para essa finalidade. Nesse estudo, a alimentação de ratos com dieta contendo proteína na forma de *spirulina*, dos 30 dias até a idade adulta (90 dias), não prejudicou ganho de peso e comprimento corporais. A ingestão alimentar dos animais alimentados com a dieta *spirulina* foi menor, mas não de forma significativa, se comparada com aqueles mantidos com a dieta caseína. Não foi observada diferença entre os ratos alimentados com *spirulina* e caseína em relação às concentrações de proteína e albumina séricas. Ainda, os animais pertencentes ao grupo *spirulina* não demonstraram outras características comumente presentes na desnutrição protéica em crianças e animais, como por exemplo, hipoglicemia e concentrações elevadas de lipídios no fígado, sugerindo, então, que a *spirulina* como única fonte protéica na dieta não induz sinais ou evidências de desnutrição protéica em ratos. Nossas observações sobre peso muscular, teores de proteína e quantidade de DNA

indicam que a *spirulina* como única fonte protéica na dieta não impede e/ou não prejudica hiperplasia tampouco hipertrofia em músculo esquelético de ratos jovens. No que se refere às taxas de degradação protéica no músculo sóleo incubado, os valores foram similares em ambos os grupos, no entanto, as taxas de síntese protéica foram maiores nos animais alimentados com *spirulina*. Ainda, a expressão da proteína miosina (análise por meio de *western blotting*) mostrou-se aumentada nos animais alimentados com a dieta contendo *spirulina* como fonte protéica. Podemos sugerir, a partir desses resultados referentes ao metabolismo protéico, que a maior taxa de síntese protéica determinada no grupo *spirulina* assim como elevada expressão protéica de miosina, se comparado ao grupo caseína, pode ser devida a alguma alteração nas cascatas de sinalização responsáveis pela estimulação da síntese protéica na musculatura esquelética desses animais, mediada pela insulina e/ou por aminoácidos contidos na dieta com proteína na forma de *spirulina*. Nesse sentido, um interessante passo a ser investigado futuramente é o papel da via mTOR sobre os efeitos aqui observados. Além disso, o balanço nitrogenado não foi determinado para o presente trabalho, o qual poderia ser de grande importância no sentido de avaliar o valor biológico da *spirulina* como fonte protéica na dieta. Mais estudos são necessários para se determinar e esclarecer os reais mecanismos envolvidos nos efeitos da *spirulina* como fonte protéica na dieta sobre o metabolismo protéico muscular.

O segundo trabalho desenvolvido (**Capítulo 3**), também aqui apresentado, baseou-se no princípio de que a desnutrição protéica é, ainda, hoje, grave problema médico-social nos países em desenvolvimento. Assim, é de grande interesse o desenvolvimento de procedimentos mais efetivos no seu tratamento. Isso inclui o emprego do exercício físico bem como de novas fontes de proteína na alimentação. Portanto, esse estudo foi delineado para determinar a transição metabólica

aeróbia/anaeróbia (TM) durante o teste do lactato mínimo (TLM), adaptado às condições do rato em exercício de natação, em animais sedentários submetidos à desnutrição protéica. Pôde-se observar, nesse terceiro estudo, que os ratos desnutridos mostraram ganho de peso corporal e incremento no comprimento corporal reduzidos, baixas concentrações de proteína sérica, albumina e AGL (talvez devido à inibição da 6-desaturase, uma enzima chave na síntese dos ácidos graxos, aparece inibida na situação de jejum e nas deficiências de insulina, proteína e zinco, condições frequentemente observadas em crianças desnutridas) e elevada concentração de lipídio no fígado (ocorre como conseqüência do transporte deficiente de lipídios para fora do fígado em organismos acometidos pela deficiência protéica) quando comparados ao grupo controle. Apesar do baixo ganho de peso corporal observado nos animais desnutridos, não foram encontradas diferenças significativas na ingestão alimentar por grama de peso corporal, observada durante o período experimental, entre os dois grupos, representando assim, deficiência protéica e não deficiência protéico-energética. Esses resultados, tomados em conjunto, indicam a adequação do modelo animal de desnutrição protéica utilizado no presente estudo. A TM calculada para o rato controle foi obtida na carga de 4,8% do peso corporal na concentração de 6,3mmol/L de lactato sanguíneo. Em relação ao animal desnutrido, a TM foi calculada na carga de 4,9% do peso corporal a 4,2mmol/L de concentração de lactato sanguíneo. A análise das curvas individuais (demonstradas nas Figuras 1 e 2) permitiram a determinação da TM, obtida através da efetuação do TLM, individualizada para cada animal. Os valores médios calculados de TM, expressos como a carga na qual o lactato sanguíneo mínimo apareceu, para todos os animais de ambos os grupos, foi de $4,9 \pm 0,3\%$ do peso corporal a $6,2 \pm 0,1$ mmol/L de lactato sanguíneo no grupo controle (n=10), enquanto que o grupo desnutrido (n=10) teve a TM obtida na carga de $4,9 \pm 0,2\%$ do peso corporal a

4,2±0,4mmol/L de lactato sanguíneo. Os valores mais baixos de lactato sanguíneo observado nos animais alimentados com a dieta hipoprotéica em relação aos animais controle (alimentados com a dieta normoprotéica) para uma mesma carga de exercício, podem ser, pelo menos em parte, atribuídos às alterações em atividades enzimáticas. Existem dados na literatura indicando redução da atividade de várias enzimas teciduais em organismos submetidos à restrição protéica, principalmente enzimas pertencentes à via glicolítica, em especial a lactato desidrogenase (LDH). Com isso, uma alteração enzimática, originada pela desnutrição protéica, poderia acarretar em inibição da via glicolítica, modificando assim a concentração de lactato sanguíneo durante o exercício. No entanto, para a confirmação dessa hipótese, seria necessário mensurar, principalmente, a atividade da enzima LDH nesses animais.

A terceira questão (**Capítulo 4**) levantada na presente Tese de Doutorado foi baseada na premissa de que há escassez de informações acerca dos efeitos da *spirulina* sobre os tecidos com elevadas taxas metabólicas durante a recuperação da desnutrição proteica. Sabe-se que o músculo esquelético é suscetível à desnutrição protéica e isso se deve ao fato de que o mesmo é um dos mais importantes estoques de proteína do organismo. Portanto, quando há deficiência de proteína na dieta, esse tecido se torna alvo de depleção. Assim, a presente etapa teve como objetivo avaliar os efeitos da *spirulina* como única fonte protéica na dieta em ratos previamente submetidos à desnutrição sobre o crescimento corporal bem como sobre o metabolismo protéico muscular. Além disso, a atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) foi acessada no músculo sóleo dos animais com o intuito de inferir sobre a atividade celular desse tecido.

Ganhos no crescimento e comprimento corporais prejudicados, hipoalbuminemia, hipoproteinemia e conteúdos elevados de lipídios e glicogênio

hepáticos, como observado em nossos animais experimentais mantidos com uma dieta pobre em proteína na presente etapa, são características comumente encontradas no Kwashiorkor infantil e em animais acometidos pela desnutrição protéica. Isto indica a adequação do modelo animal de desnutrição protéica usado no presente trabalho. A concentração sérica de AGL observada nos ratos pertencentes ao grupo C6, do presente estudo, foi significativamente menor em relação aos animais alimentados com a quantidade normal de proteína (C17 e S17). Isto confirma resultados prévios obtidos pelo nosso grupo. Estudos usando animais experimentais mostraram que 6-desaturase, uma enzima chave na síntese de AG essenciais, apareceu inibida em jejum e em deficiências relacionadas à insulina, proteína e zinco, condições frequentemente observadas em crianças desnutridas. Todos os parâmetros somáticos, sanguíneos e teciduais foram restabelecidos pelas dietas balanceadas contendo tanto caseína como *spirulina* nos grupos recuperados (C6/C17 e C6/S17). Os efeitos positivos da *spirulina*, similares aqueles obtidos com a caseína, para a recuperação da desnutrição protéica, foram também observados por nós em estudo prévio utilizando animais adultos, reforçando o valor nutricional dessa alga. Os conteúdos de proteína total e DNA bem como a razão proteína/DNA no músculo sóleo foram diminuídos nos animais previamente submetidos à desnutrição protéica se comparados aos grupos C17 e S17, sugerindo tanto hipoplasia como hipotrofia da musculatura esquelética. Tal situação foi revertida nos grupos C6/C17 e C6/S17 ao final do experimento, indicando que a *spirulina* como única fonte de proteína na dieta mostrou-se eficiente em promover crescimento hiperplásico e hipertrófico na musculatura esquelética de ratos jovens desnutridos.

Após 16 semanas de tratamento com a dieta experimental (8 semanas de restrição protéica na dieta seguidas de 8 semanas de recuperação nutricional), as taxas

de síntese protéica foram restabelecidas pelas dietas normais balanceadas contendo caseína e *spirulina*. Ao final do experimento, quando analisados os grupos C6/C17 e C6/S17 e comparados aos grupos C17 e S17, não se observou diferenças nos valores de síntese protéica obtidos. O mesmo foi observado em relação à degradação protéica. Ainda, no presente estudo, a atividade da FA foi maior no músculo sóleo dos animais desnutridos (C6) quando comparados aos grupos C17 e S17. Isso pode ser devido, pelo menos em parte, ao desbalanço do turnover protéico nesse tecido, o qual pode ter sido induzido pela restrição de proteína na dieta. Por outro lado, os ratos recuperados da desnutrição (C6/C17 e C6/S17) apresentaram seus níveis musculares de FA restaurados, quando comparados aos grupos C17 e S17, concomitantemente com o aumento das taxas de síntese e diminuição das taxas de degradação protéicas nesse tecido.

A partir dos resultados obtidos e discutidos nos três estudos (Capítulos 2, 3 e 4), podemos concluir que:

- Com respeito ao valor biológico da proteína *spirulina* para organismos jovens:
 - a) os resultados do presente estudo sugerem certas reflexões sobre o valor nutricional da *spirulina* como fonte protéica;
 - b) O elevado valor nutricional dessa proteína é demonstrado pelo adequado crescimento corporal e pela ausência de anormalidades bioquímicas nos tecidos de ratos jovens alimentados com essa dieta experimental e
 - c) foi encontrada indicação importante de alteração metabólica: o aumento das taxas de síntese protéica e da expressão da proteína miosina observado no músculo sóleo desses animais.
- Em relação ao exercício praticado por organismos portadores de desnutrição protéica:
 - a) os resultados aqui apresentados mostram que o modelo animal

avaliado é adequado para o estudo da desnutrição protéica associada ao exercício; **b)** foi possível determinar a transição metabólica aeróbio/anaeróbio em ratos desnutridos através do teste do lactato mínimo durante exercício de natação; **c)** os animais desnutridos apresentaram concentração de lactato sanguíneo equivalente à transição metabólica, obtida durante o teste do lactato mínimo, mais baixa em relação aos animais controle para uma mesma carga de exercício, indicando que a restrição protéica altera a cinética de lactato sanguíneo durante a natação em ratos e **d)** mais estudos são necessários a fim de se identificar as causas reais da diminuição da concentração de lactato sanguíneo, durante a realização do exercício físico, verificada nos animais submetidos à desnutrição protéica.

- Quanto ao valor biológico da proteína spirulina na recuperação da desnutrição protéica: **a)** alimentar ratos previamente submetidos à restrição protéica com dietas balanceadas contendo caseína ou spirulina mostrou ser eficiente em reverter as alterações no crescimento muscular e no metabolismo protéico induzidas pela desnutrição protéica e **b)** ambas as dietas provaram ser igualmente eficientes nesse sentido e esse fato demonstra o potencial valor da proteína originária da alga na recuperação da desnutrição protéica.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ADHIOHETTY, P.J; HOOD, D.A. Mechanisms of apoptosis in skeletal muscle. **Basic Appl. Myol.** 13(4): 171-179, 2003.

ALBANES, S.D; SALBE, A.D; LAVANDER, D.A; TAYLLOR, P.R; NIXON, D.W; WINICK, M. The effect of early caloric restriction on colonic cellular growth in rats. **Nutr. Cancer.** 13: 73-80, 1990.

ANDERSON, G.O; AHOKAS, R.A; LIPSRTIZ, J; DILTS, P.U. Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on maternal weight gain and fetal birth weight in the rats. **J. Nutr.** 110: 883-889, 1980.

ANTOV, A.N. Children born during the siege in Leningrad in 1942. **J. Pediatr.** 30: 250-259, 1947.

ARAÚJO, K.G.L; FACCHINETTI, A.D; SANTOS, C.P. Influência da ingestão de spirulina (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. **Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas.** 23(1): 6-9, 2003.

ATTAIX, D. Regulation of proteolysis. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.** 4: 45-49, 2001.

BARBIRAK, S.P; DOWELL, R.T; OSCAI, L.B. Total fasting and total fasting plus exercise: effects on body composition of the rat. **J. Nutr.** 104: 452-457, 1974.

BASS, E.L; ESER, P; DALY, R. The effect of exercise and nutrition on the mechanostat. **J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.** 5(3): 239-254, 2005.

BATISTA FILHO, M; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. Saúde Pública**. 19(1): 5181-5191, 2003.

BELAY, A; OTA, Y; MIYAKAWA, K; SHIMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of spiruline. **J. Appl. Physic**. 5: 235-241, 1993.

BEMBEN, A; KNEHANS, W; GLORE, S.R. Changes in the plantaris muscle as an indicator of alterations in lean body mass of obese Zucker rats following prolonged restriction and subsequent partial recovery. **Eur. J. Appl. Physiol. and Occup. Physiol**. 76(3): 277-284, 1997.

BILLAT, V.L; SIRVENT, P; KORALSZTEIN, J.P; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science (review). **Sports Med**. 33(6): 407-426, 2003.

BLACKBURN, G.L. Pasteur's quadrant and malnutrition. *Nature*. 409: 397-401, 2001.

BODINI, S.C; STITT, T.N; GONZALEZ, M; KLINE, W.O; SDTOVER, G.L; BAUERLEIN, R; ZLOTCHENKO, E; SCRIMGEOUR, A; LAWRENCE, J.C; GLASS, D.J; YANCOPOULOUS, G.D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo*. **Nature Cell Biol**. 3: 1014-1019, 2001.

BOLSTER, D.R; JEFFERSON, L.S; KIMBALL, S.R. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin, amino acids and exercise-induced signaling. **Proc. Nutr. Society**. 63: 351-356, 2004.

BORER, K.T. Characteristics of growth-inducing exercise. **Physiol. Behav**. 24: 499-505, 1979.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 7(72): 48-54, 1976.

BURNS, S.I; STONE, J; HOPPER, J.L; SEEMAN, E. Diet and exercise during growth have site specific skeletal effects: a co-twin control study. **Osteoporos. Int.** 10: 209-218, 2005.

CALHAU, C; HIPÓLITO, R.C; AZEVEDO, I. Alkaline phosphatase and exchange surfaces. **Clin. Bioch.** 32 (2): 153-154, 1999.

CAPPER, A. Fate and development of the immature and premature child: clinical study. **Am. J. Dis. Child.** 35: 362-388, 1928.

CASTRO, J. **Geopolítica da fome.** 7^a ed., Rio de Janeiro, Editora Brasiliense. vol. 1, 54-55, 1965.

COMBS, W; SONIS, S.T; FITZGERALD, J; TRACY, C; WILSON, R. *In vivo* and *in vitro* effects of beta carotene and algae extracts in murine tumor models. **Nutr. Cancer.** 12: 371, 1989.

CREWS, E.L. Weight, food intake and body composition: effects of exercise and protein deficiency. **Am. Physiol.** 216: 359-363, 1969.

DURAN, P; CINTRA, L; CALLER, J.R; TONKISS, J. Prenatal protein malnutrition induces a phase shift advance of the spontaneous locomotor rhythm and alters the rest/activity ratio in adult rats. **Nutr. Neurosci.** 8(3): 167-172, 2005.

Ecosoc Continues General Discussion Under its Humanitarian Affairs Segment: Importance of Increased, Balance Funding for Humanitarian Assistance Stresses. Inform of Gilles Grillet (Intergovernmental Institution for the Use of Micro-Alga Spirulina against Malnutrition - France) in The Economic and Social Council – July 15th, 2003. (www.unhche.ch/hurricane/hurricane.nsf).

FERRARI, F; GABRIELLE, P.R.M; MELLO, M.A.R. Restrição alimentar durante a gestação e suas implicações sobre o binômio mãe/feto: um modelo experimental utilizando ratas jovens e adultas. **Alimentos e Nutrição**. 4: 45-56, 1992.

FICA, V; OLTEANU, D; OPRESCU, S. Use of spiruline as an adjuvant nutrient factor in the therapy of the diseases accompanying a nutritional deficiency. **Rev. Med. Int. Med. Int.** 36: 225, 1984.

FINGAR, D.C; SALAMA, S; TSOU, C; HARLOW, E; BLENIS, J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its down-stream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. **Genes and Develop.** 16: 1472-1487, 2002.

FOOD AND ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Assessment of the World Food Security Situation**. Committee on World Food Security Twenty-Seventh Session, Rome, May 28, June 1, 2001.

FULKS, R.M; LI, J.B; GOLDBERG, J.L. **J. Biol. Chem.** 250: 290-298, 1975.

FURST, P.T. Spiruline – a nutritious alga, once, a staple of Aztec diet, could feed many of the world's hungry people. **Human Nature**. 60: 459-470, 1978.

GALDINO, R. **Atividade física e ingestão da dieta hipoprotéica durante a gestação em ratas: efeitos sobre a gestante e o desenvolvimento fetal**. Rio Claro-SP. Dissertação (Mestrado em Ciências da Motricidade) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1996.

GALDINO, R; ALMEIDA, C.C.S; LUCIANO, E; MELLO, M.A.R. Protein malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to exercise training. **Nutr. Res.** 20: 527, 2000.

GALDINO, R; MELLO, M.A.R; ALMEIDA, R.L; ALMEIDA, C.C.S. Desnutrição protéico-calórica. In: DÂMASO, A. **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. v.1, MEDSI, 225-275, 2001.

- GILES, K.W; MEYRES, A. An improved diphelinanine method for the estimation of dioxinucleic. **Nature**. 206: 93-115, 1965.
- GLICKMAN, M.H; CHIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteosome proteolytic pathway: destruction of the sake of construction. **Physiol. Rev.** 82: 373-428, 2002.
- GLORE, S.R; LAYMAN, D.K. Cellular development of skeletal muscle of rats during recovery from prolonged undernutrition. **J. Nutr.** 117(10): 1767-1774, 1987.
- GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R; SIBUYA, C.Y; AZEVEDO, J.R.M; SANTOS, L.A; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp. Bioch. Physiol.** 130: 21-27, 2001.
- GOMES, F. Desnutrition. **Bol. Hosp.** 3: 543-551, 1946.
- GRINSTEAD, G.S; TOKACH, M.D; DRITZ, S.S; GOODBAND, R.D; NELSSSEN, J.L. Effects of *spirulina plantesis* on growth performance of weanling pigs. **Animal Feed Sci. Techn.** 83: 237-247, 2000.
- HALES CN; BARKER DJP. The thrifty phenotype hypothesis. **British Journal Bulletin.** 60: 5-20, 2001.
- HALES CN; BARKER DJP. Type 2 (non insulin dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia.** 35: 595-601, 1992.
- HERNÁNDEZ, A.R; CASTILLO, J.L.B; OROPEZA, M.A.J; ZAGOYA, J.C.D. Spirulina maxima prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. **Life Sci.** 69: 1029-1037, 2001.
- HINZ, G; THIELE, D; DORNER, G. Effect of neonatal malnutrition on body weight gain in guinea pig. **Acta Biol. Med. Germ.** 35: 1525-1532, 1976.
- IWATA, K; INAYAMA, T; KATO, T. Effects of *spirulina plantesis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. **J. Nutr. Sci. Vitamiol.** 36: 165-171, 1990.

JELLIFFE, D. B. **The assessment of the nutritional status of the community: with special reference to field surveys in developing regions of the world.** Geneva, WHO, 1966.

JONES, A. M. and J. H. DOUST. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8 Km running performance. **Med. Sci. Sports Exer.** 30: 1304 – 1313, 1998.

KAY, R.A. Microalgae as food and supplement. **Clin. Rev. Food. Sci. Nutr.** 30(6): 555-573, 1991.

KAPPOR, R; MEHTA, U. Supplementary effect of spiruline on hematological status of rats during pregnancy and lactation. **Plant. Foods Hum. Nutr. Aliment.** 29(6): 517-534, 1998.

KEE, A.J; TAYLOR, A.J; CARLSSON, A.R; SEVETTE, A; SMITH, R.C; THOMPSON, M.W. IGF-I has no effect on post exercise suppression of the ubiquitin-proteasome system in rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** 92: 2277-2284, 2002.

KOHR, M.B; KERR, G.R; HARPEN, A.E. Effect of low protein diet during pregnancy of rhesus monkey 3: growth of infants. **Am. J. Clin. Nutr.** 33: 625-630, 1980.

LATORRACA MQ; CARNEIRO EM; BOSCHERO AC; MELLO MAR. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and early steps on insulin action in rats. **J. Nutr.** 128: 16432-1649, 1998.

LATORRACA MQ; CARNEIRO EM; MELLO MAR ; BOSCHERO AC. Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with diminished calcium uptake. **J. Nutr. Biochem.** 10: 37-43, 1999.

- LATORRACA, M.Q; CARNEIRO, E.M; BOSCHERO, S.C; MELLO, M.A.R. Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose induce insulin secretion but increases the sensivity to insulin in weaned rats. **Br. J. Nutr.** 80: 277-291, 1998.
- LATORRACA, M.Q; GOBATTO, C.A; CARNEIRO, E.M; GALDINO, R.S; SIBUYA, C.Y; MELLO, M.A.R. Descrição de dieta purificada para indução de quadro de desnutrição protéica em ratos. **Rev. Bras. Med. Esporte.** 4: 9-12, 1998.
- LO, S; RUSSEL, J.C; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.** 28 (2): 234-236, 1970.
- LOWRY, O.H; ROSEBROUG, N.J; FARR, A.L; RANDALL, R.T. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275, 1951.
- MELLO MAR; LUCIANO E; CARNEIRO EM; LATORRACA MQ; OLIVEIRA CAM; BOSCHERO AC. Glucose homeostasis in pregnant rats submitted to protein restriction. **Res. Commun. Mol. Pathol. and Pharmacol.** 113/114: 229-248, 2003.
- MENDONÇA, R. O paradoxo da miséria. CSC (www.desnutricao.org.br). 1-12, 2003.
- MONTEIRO CA; MONDINI L; DE SOUZA AL; POPKIN EM. The nutrition transition in Brazil. **Eur. J. Clin. Nutr.** 49(2): 105-113, 1995.
- MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil: implicações para políticas públicas. **Seminário Especial Fome e Pobreza**, Rio de Janeiro, Setembro/2003.
- MOURA, E.C.V. Fontes protéicas não convencionais: perspectivas de seu emprego na alimentação. Nóbrega, F.J. **Desnutrição intra-uterina e pós-natal**. São Paulo, Panamed, 35-56, 1981.
- NAGASAWA, H; KONISHI, R; SENSUI, N; YAMAMOTO, K; BEN-AMOTZ, A. Inhibition by beta carotene rich algae *Dunaliella* of spontaneous mammary tumourigenesis in mice. **Anticancer Res.** 9: 71, 1989.

NAKAYA, N; HOMMA, Y; GOTO, Y. Cholesterol lowering effect of spiruline. **Nutr. Rep. Intern.** 37: 1329-1337, 1998.

NASCIMENTO, O.J; MAD, K; GUEDES e SILVA, J.B; SOARES FILHO, P.J; HAHN, M.D; COUTO, B; FREITAS, M.R. Striadic muscle in protein malnutrition: an experimental study in albino rats. **Archiv. Neuropsiq.** 48(4): 395-402, 1990.

NOGUEIRA, D.M; STRUFALDI, B; HIRATA, M.H; ABDALLA, D.S.P; HIRATA, R.D.C. Métodos de bioquímica clínica, São Paulo: Pancas Editorial, 1990.

OZANNE SE; HALES CN. Life span: catch up growth and obesity in male mice. **Nature.** 427: 411-412, 2004.

PETRY CJ; OZANNE SE; WANG CL; HALES CN. Effects of early protein restriction and adult obesity on rat pancreatic hormone content and glucose tolerance. **Horm. Metab. Res.** 32: 233-239, 2000.

POPKIN, B.M. The nutrition transition and obesity in the developing world. **J. Nutr.** 131: 3715-8735, 2001.

POWERS, S.K; HOWLEY, E.T. **Fisiologia do Exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho.** Editora Manole. 3ª. Edição. São Paulo – 2000.

REEVES, P.G; NIELSEN, F.H; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition AdHoc Writing Committee on the Reformulation of AIN-76A. **J. Nutr.** 123: 1938-1951, 1993.

REYNOLDS, T.H; BODINE, S.C; LAWRENCE, J.C. Control of Ser phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. **J. Biol. Chemist.** 277: 17657-17662, 2002.

ROCHA, R; SIMÕES, G.C; PORTO, M; MELLO, M.A.R. Desnutrição protéico-calórica e crescimento corporal. Influência do exercício na recuperação nutricional de ratos. **Alim. Nutr.** 8: 7-16, 1997.

- SAKAMOTO, K; GRUNEWALD, K.K. Beneficial effects of exercise on growth of rats during intermittent fast. **J. Nutr.** 117: 390-395, 1987.
- SALAZAR, M; MARTÍNEZ, E; MADRIGAL, E; RUIZ, L.E; CHAMORRO, G.A. Subchronic toxicity study in mice fed spiruline maxima. **J. Ethnopharm.** 62: 235-241, 1998.
- SAWAYA, A. L. **Aspects of energy metabolism in protein malnourished rats.** Tese de PhD, Darwin College, Cambridge, Inglaterra, 1985.
- SMITH, C.A. Effects of maternal undernutrition on new born weight in Holland (1944-5). **J. Pediatr.** 29: 517-534, 1947.
- SNOECK A; REMACLE C; REUSENS B; HOET JJ. Effects of a low protein diet during pregnancy on fetal rat endocrine pancreas. **Biol Neonate**, 57: 107-118, 1990.
- STEWART, J.C; PRECE, R.F; SHEPPARD, H.G. Twelve generation of marginal protein deficiency. **Br. J. Nutr.** 33: 233-253, 1975.
- STUPKA, N; TARNOPOLSKY, M.A; YARDLEY, N.J; PHILIPS, S.M. Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. **J. Appl. Physiol.** 91: 1669-1678, 2001.
- SWENNE I; CRACE CJ; MILNER RDG. Persistent impairment of insulin secretory response to glucose in adult rats after a limited period of protein calorie malnutrition. **Diabetes.** 36: 454-458, 1987.
- TAILLANDIER, D; COMBARET, L; POUCH, M.N; SAMUELS, S.E; BÉCHET, D; ATTAIX, D. The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodeling of skeletal muscle. **Proc. Nutr. Society.** 63: 357-361, 2004.
- TAMAKI, H; SUN, L; OHTA, Y; KATSUYAMA, N; ISHIMARU, T; CHINEN, I. Running inhibits osteoporosis induced by protein deficient (PD) in food intake. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 68(7): 1578-1580, 2004.

- TANNENBAUM, S.R. Single cell protein. **MIT**. 2: 40-78, 1975.
- TEGTBUR, U; M. W. BUSSE and K. M. BRAUMANN. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise . **Med. Sci. Sports Exer**. 25: (5): 620-627, 1993.
- THOMPSON, H.S; SCORDILIS, S.P; Ubiquitin changes in human biceps muscle following exercise-induced damage. **Bioch. Biophys. Res. Commun**. 204: 1193-1198, 1994.
- TORUM, B; CHEW, F. Protein energy malnutrition. In. Shils M, Olson JA, Shike M (eds). **Modern Nutrition in Health and Disease**, v.2, Lea & Febiger: Philadelphia; 950-976, 1994.
- TORUN, B; VITERI, F. Influence of exercise on linear lactate. **Eur. J. Clin. Nutr**. 48(1): 5186-5190, 1994.
- VENTRUCI, G; SILVA, L.G.R; MELLO, M.A.R; MARCONDES, M.C.C.G. Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats. **Nutrition**. 20(2): 213-217, 2004.
- VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz. J. Med. Biol. Res**. 35: 1389-1394, 2002.
- VOLTARELLI, F.A; NUNES, W.M.S; SILVA, A.S.R; ROMERO, C.E.M; GARCIA, D.R; PAULI, J.R; SANTHIAGO, V; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. Determinação do limiar anaeróbio em ratas obesas tratadas com glutamato monossódico (MSG). **Rev. Logos**. 11: 84-92, 2003.
- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; GOBATTO, C.A. Limiar anaeróbio determinado pelo teste do lactato mínimo em ratos: efeito dos estoques de glicogênio muscular e do treinamento físico. **Rev. Port. Ciências Desp**. (4) 3: 16-25, 2004.

WAALKES, T.P; UDENFRIEND, S. Tyrosine in plasma and tissues. **J. Lab. Clin. Med.** 50(5): 733-736, 1957.

WATERLOW, D.C; ALLEYNE, G.A.O. **Má nutrição em crianças: evolução dos conhecimentos nos últimos 10 anos.** Nestlé, São Paulo, 61-67, 1974.

WILLOUGHBY, D.S; PRIEST, J.W; JENNINGS, R.A. Myosin heavy chain isoform and ubiquitin protease mRNA expression after passive leg cycling in persons with spinal cord injury. **Arch. Physical Med. Rehab.** 81: 157-163, 2000.

WINICK, M; BASEL, J.A; ROSSO, P. Nutrition and cellular growth. In: Winick, M. **Nutrition and development**, John Willey, 49-97, 1972.

WINICK, M; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition. **S. Nutr.** 89: 300-306, 1996.

WRAY, C. D.; MAMMEN, J. M.; HASSELGREEN, P. O. Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. **Nutrition.** 18(11/12): 971-977, 2002.

ZANELATTO, R.A; FERRARI, F; MELLO, M.A.R. Desnutrição protéico-calórica e crescimento corporal. Influência do exercício na recuperação nutricional de ratos. **Alim. Nutr.** 8: 7-16, 1992.

10- ANEXOS

10.1- Apresentação do artigo científico, derivado da presente Tese de Doutorado, Publicado na Revista Motriz (Unesp-Rio Claro) (2008):

VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R. *Desnutrição Metabolismo protéico muscular, spirulina e recuperação nutricional associada ao exercício*

Motriz, Rio Claro, v.14 n.1 p.74-84, jan./mar. 2008

Artigo de Revisão

Desnutrição: metabolismo protéico muscular e recuperação nutricional associada ao exercício

Fabrício Azevedo Voltarelli
Maria Alice Rostom de Mello

Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física - UNESP Rio Claro, SP, Brasil

Resumo: A desnutrição é, ainda hoje, grave problema médico-social nos países em desenvolvimento. Assim, é de grande interesse o desenvolvimento de procedimentos mais efetivos no seu tratamento. Isso inclui o emprego do exercício físico. O presente estudo teve como objetivo revisar: a) os principais tópicos referentes aos efeitos da desnutrição sobre o organismo, bem como à sua recuperação através da alimentação associada ao exercício físico e b) o metabolismo protéico muscular de ratos em recuperação da desnutrição protéica. Para atingir tal fim, realizou-se uma revisão bibliográfica minuciosa dos principais trabalhos científicos publicados pelo nosso grupo de trabalho, e por outros pesquisadores na área, nos últimos anos.

Palavras-chave: Desnutrição. Metabolismo protéico muscular. Recuperação nutricional. Exercício físico.

Malnutrition: muscle protein metabolism and nutritional recovery associated to the exercise

Abstract: Today, malnutrition still remains the single most important factor impairing health and productivity of large human populations, mainly in the developing countries. For this reason, the exploration of alternative treatments, in addition to nutritional recovery, became a matter of generalized interest, and this includes the employment of physical exercise. The present study aimed to review: a) the main topics related to malnutrition effects on organism as well as nutritional recovery through dietary procedures associated to physical exercise and b) Muscle protein metabolism of rats recovering from protein malnutrition. To reach the objective of the present study, a bibliographic review process was applied and scientific papers published by our work group and by other groups in this area, were used.

Key Words: Malnutrition. Muscle protein metabolism. Nutritional recovery. Physical exercise.

Introdução

Os efeitos da fome sobre populações têm sido observados desde épocas remotas e descritos através dos tempos. Contudo, pesquisas realizadas utilizando métodos científicos para avaliação da desnutrição, sua prevalência, natureza e abrangência de seus efeitos e integração com outros fenômenos, só tiveram início em épocas recentes.

Em 1928, a antiga liga das nações, sob o patrocínio de sua organização de higiene, procedeu a inquéritos em diferentes países. Foram, então, divulgados relatórios sobre as condições alimentares no mundo, demonstrando que mais de 2/3 da humanidade viviam em permanente estado de fome (CASTRO, 1965).

Mais recentemente, baseado em pesquisas nutricionais realizadas em todos os continentes, a

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FOOD, 2001) relatou que, embora em termos percentuais, tenha havido decréscimo na incidência de desnutrição entre 1990 e 1999, em números absolutos 623,7 milhões de pessoas nesses continentes ainda são acometidas por essa carência nutricional.

No Brasil, em 1996, foram efetuados inquéritos sobre o estado nutricional da população de menores de 5 anos, em áreas urbanas e rurais em diferentes regiões (MONTEIRO, 2003). Em áreas urbanas da região Centro-Sul (inclui as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul), por exemplo, a prevalência da desnutrição situou-se próximo a 4,6%, enquanto que em áreas urbanas das regiões Norte e Nordeste chegou aos 16,6 e 13,0%, respectivamente.

Há várias décadas a desnutrição protéica vem preocupando autoridades ligadas aos setores de saúde pública, principalmente a Organização Mundial de Saúde (OMS), visto que essa patologia implica em comprometimento funcional de diversos sistemas e órgãos de seus portadores, entre eles, a musculatura esquelética (TORUN; CHEW, 1994). Algumas alterações são totalmente revertidas com a recuperação nutricional, enquanto outras, não.

Por outro lado, sabe-se que a prática regular de atividade física exerce efeitos benéficos para a saúde, tais como aumento da capacidade oxidativa e do crescimento muscular, melhora das condições cardiorrespiratórias e facilitação da mineralização óssea, entre outros (BURNS et al., 2005). Assim sendo, o presente trabalho de revisão visa fornecer uma visão geral sobre: a) os principais tópicos relacionados aos efeitos da desnutrição sobre o organismo, bem como à sua recuperação através da alimentação associada ao exercício físico e b) o metabolismo protéico muscular de ratos em recuperação da desnutrição protéica.

Desnutrição: características gerais

A desnutrição, ou mais corretamente, as deficiências nutricionais – porque são várias as modalidades de desnutrição – são doenças que decorrem do aporte alimentar insuficiente em energia e nutrientes ou, ainda, com alguma frequência, do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos, geralmente motivado pela presença de doenças, em particular infecciosas (MONTEIRO, 2003).

As conseqüências da desnutrição para o organismo são variadas, entretanto desde as formas leves às mais severas é constante o comprometimento do crescimento. Por essa razão, são utilizados indicadores antropométricos com a finalidade de diagnosticar a desnutrição infantil. O parâmetro mais usado é a adequação percentual do peso corporal do indivíduo em relação à idade. A classificação mais empregada para avaliar o estado nutricional de crianças de 1 a 4 anos é a proposta por Gomes (1946) e prevê três graus para a desnutrição, conforme o déficit ponderal seja de 10 a 24% (primeiro grau ou leve), de 25 a 40% (segundo grau ou moderada) ou maior de 40% (terceiro grau ou grave). *Marasmo* e *Kwashiorkor* são duas síndromes que correspondem a manifestações extremas da

desnutrição de terceiro grau (TORUN; CHEW, 1994).

O *Kwashiorkor* manifesta-se com maior frequência nos três primeiros anos de vida, especialmente no segundo. 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).

O *Marasmo* instala-se nos primeiros anos, preferencialmente no decorrer do primeiro ano. Tem sido freqüentemente observado em crianças com 6 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 atrofia muscular e redução de gordura subcutânea (TORUN; CHEW, 1994).

Ainda existe considerável discussão sobre as diferenças na etiologia dessas duas síndromes reconhecidas da desnutrição. Embora elas sejam vistas como doenças que marcam os pontos finais do espectro das doenças também conhecidas pelo termo desnutrição protéico-calórica e que foi usado pela primeira vez por Jelliffe em 1966, alguns autores sugeriram que ambas as formas de desnutrição poderiam resultar de um mesmo tipo e grau de privação dietética (SAWAYA, 1985). Outros acreditam que o *kwashiorkor* é basicamente uma deficiência protéica e o *marasmo* uma deficiência energética. Parece que as diferenças na etiologia podem ocorrer de acordo com as áreas geográficas, tipo de alimento, idade, ausência ou presença de algumas infecções, diarreia etc.

Ambas as doenças ocorrem mais freqüentemente entre crianças e bebês vivendo em zonas pobres dos países em desenvolvimento. Até a década de 1960, o *kwashiorkor* foi considerado a forma de desnutrição predominante, talvez por causa das suas características patológicas e metabólicas exóticas, muito diferentes das doenças encontradas na Europa. Hoje, se sabe, porém, que o *marasmo* é mais freqüente (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003).

No entanto, apesar do ritmo acelerado com que se processa a redução da desnutrição no

F. A. Voltarelli & M. A. R. Mello

Brasil, ainda não existe uma região onde se tenha completado a correção do déficit de estatura de crianças menores de cinco anos. O objetivo de se atingir os valores da curva de referência de crescimento (tabela do National Center of Health Statistics – NCHS – universalmente recomendada) está relativamente próximo de ser alcançado nas populações urbanas do Sudeste, Sul e Centro-Oeste, mas ainda acha-se bem distante no Norte e Nordeste (MONTEIRO, 2003). Nessas duas regiões, há a prevalência da carência protéica (de forma endêmica), o que pode aumentar a incidência e instalação do *Kwashiorkor* nessa população, sobrepondo-se à instalação do marasmo (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003).

A desnutrição do tipo *Kwashiorkor* pode ser caracterizada pela deficiência de proteína na dieta, além de vitaminas e sais minerais, onde a alimentação ingerida na forma de carboidrato é normal (arroz, milho e mandioca, por exemplo; alimentos de baixo custo), não ocorrendo o mesmo com a ingestão de fontes alimentares ricas em proteínas (como por exemplo, a carne bovina e/ou de aves; alimento de custo elevado). Os danos do *kwashiorkor* para o organismo são principalmente sobre o sistema imunológico, a ponto de qualquer infecção ser mortal para o indivíduo acometido e, ainda, esses danos são, na maioria dos casos, irreversíveis nesse tipo de desnutrição, tornando-a assim uma síndrome com menor grau de adaptação em relação ao marasmo (MENDONÇA, 2003).

A desnutrição durante a fase intra-uterina é assunto que tem sido abordado com destaque a partir da década de 1970. Entretanto, já em 1928, CAPPER distinguiu prematuros de recém-nascidos pequenos de gestação a termo e, na ocasião, observou-se que os últimos evoluíram para escolares atrasados, potencialmente neuróticos ou psicóticos. Antov (1947) demonstrou que, durante o cerco de Leningrado, na Segunda Guerra Mundial, ocorreu diminuição de cerca de 500 a 600g no peso das crianças ao nascer. Os estudos de Smith (1947), a respeito da desnutrição materna ocorrida na Holanda em 1945, sobre o desenvolvimento fetal, acusaram diminuição de 240g no peso ao nascer. Após essas constatações iniciais, vários foram os trabalhos clínicos e experimentais desenvolvidos nessa área.

Estudos efetuados em animais de laboratório, como ratos, cobaias e macacos, mostraram que a

deficiência de proteínas (LATORRACA et al., 1998, GALDINO et al., 2000) ou a restrição alimentar (FERRARI et al., 1992) pré-natais causam retardo no crescimento fetal. Em animais, também, a desnutrição protéica crônica, imposta a várias gerações, resultou em retardo marcante do peso ao nascer, tamanho de órgãos, maturação sexual, comportamento e padrões de aprendizagem (STEWART et al., 1975).

Crescimento celular: efeitos da desnutrição

O crescimento de qualquer órgão pode ser causado por aumento no número de células (hiperplasia), por aumento no tamanho das células já existentes (hipertrofia) ou por ambos os processos simultaneamente. O número total de células pode ser medido, com algumas exceções, determinando-se o conteúdo total de DNA do órgão e dividindo-se por uma constante que representa o conteúdo de DNA por núcleo diplóide na espécie em estudo (WINICK et al., 1972).

Determinado o número de células, o peso médio por célula, o conteúdo protéico por célula, o conteúdo de RNA por célula, entre outros, podem ser avaliados através da determinação da quantidade total de cada um desses elementos e dividindo-se pelo número de células. O resultado pode ser expresso como razões peso/DNA; proteína/DNA; RNA/DNA etc. (WINICK et al., 1972). O aumento do conteúdo de DNA representa um tipo de crescimento, ou seja, aumento do número de células; enquanto que o aumento das razões peso/DNA, proteína/DNA e RNA/DNA representam outro aspecto do crescimento, isto é, o aumento da massa tecidual sem aumento no número de células (WINICK et al., 1972).

Parece claro, à vista do exposto, que numa agressão nutricional na fase de hiperplasia, por interferir com o número de células, poderá levar à lesão irreversível. Ocorrendo insulto na fase de hipertrofia, o efeito poderia ser reversível. Portanto, os efeitos da agressão, em caso de desnutrição, dependem fundamentalmente da fase de desenvolvimento orgânico em que o organismo se encontra. Desse modo, quando a desnutrição se impõe desde o período pré-natal, suas conseqüências tendem a ser mais graves.

Com a finalidade de estudar os efeitos da desnutrição sobre esses padrões de crescimento,

Motriz, Rio Claro, v.14, n.1, p.74-84, jan./mar. 2008

Desnutrição: metabolismo protéico e exercício

Winick e Noble (1996) utilizaram 3 grupos de ratos. Um grupo sob restrição de calorias de zero a 20 dias de idade (época em que todos os órgãos, no caso, estão crescendo por divisão celular exclusivamente); o segundo grupo sob restrição dos 21 aos 42 dias (época em que o cérebro e os pulmões não estão crescendo mais por divisão celular) e o terceiro, dos 64 aos 86 dias (quando todos os órgãos estão crescendo por hiperplasia celular). Após o período de restrição, todos os animais foram realimentados.

Os resultados indicaram que restrição precoce (grupo 1) interferiu com a divisão celular e os animais apresentaram menor número de células em todos os órgãos estudados, mesmo após a realimentação. Desnutrição tardia (grupo 3) resultou em decréscimo da razão proteína/DNA (tamanho celular), com recuperação durante a realimentação. Nos animais desnutridos de 21 a 42 dias (grupo 2), todos os órgãos apresentaram redução de proteínas e peso, mas o cérebro e os pulmões apresentaram conteúdo normal de DNA enquanto que os outros órgãos tiveram conteúdo reduzido de DNA. Somente o cérebro e os pulmões recuperaram-se durante a realimentação. Estes dados suportam a hipótese de que a interferência com a divisão celular resulta em efeitos permanentes no organismo.

Albanes et al. (1990) observaram que restrição calórica (40%) imposta por três semanas, iniciada ao desmame, resultou em animais portadores de cólon mais leves, com menor número de células (menor quantidade de DNA total) e com redução da síntese de DNA (captação de 3H timidina) quando comparados a animais bem nutridos. Galdino (1996) constatou redução significativa no teor de DNA (número de células) no coração dos fetos no 19º dia de gestação.

Os efeitos da restrição energética prolongada e subsequente realimentação sobre o músculo esquelético foram estudados em ratos obesos da linhagem Zucker, os quais mostraram marcante perda da massa corporal (64%), com conseqüente perda tecidual e redução no diâmetro das fibras no músculo plantar (BEMBEN et al., 1997). Por outro lado, Bembem e colaboradores (1997) demonstraram que a realimentação aumenta o diâmetro das fibras musculares, o qual se aproxima dos valores normais de ratos bem nutridos. Similarmente, Glorie e Layman (1987) mostraram que a recuperação nutricional promove aumento na massa muscular de animais previamente submetidos à desnutrição protéico-calórica.

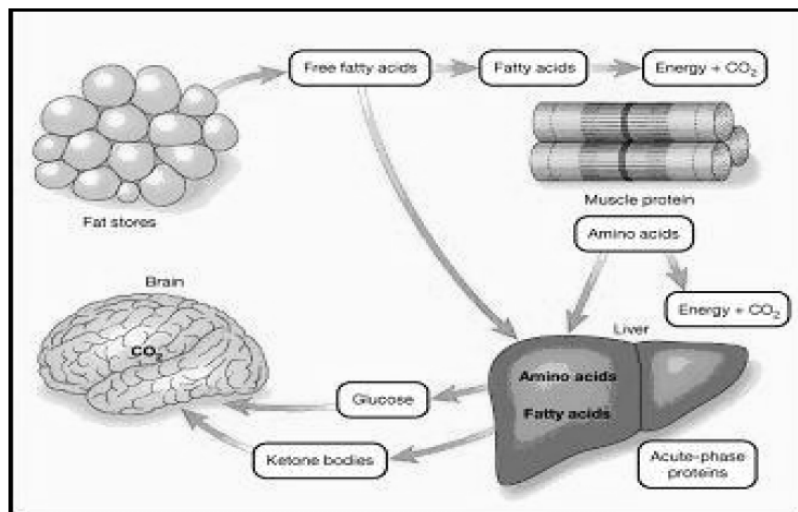


Figura 1. Perda de tecido muscular em organismos acometidos pela desnutrição protéica. (Reproduzida a partir de BLACKBURN, 2001).

Nascimento et al. (1990) observaram redução de aproximadamente 50% no peso de ratos desnutridos quando comparados com normais e um importante decréscimo no diâmetro das fibras musculares desses animais. Recentemente, em *Motriz, Rio Claro, v.14, n.1, p.74-84, jan./mar. 2008*

outro estudo, Ventrucci et al. (2004) observaram uma diminuição de cerca de 78% no peso do tecido muscular de ratos submetidos à desnutrição protéico-calórica.

F. A. Voltarelli & M. A. R. Mello

A perda de tecido muscular na desnutrição protéica pode ser considerada um mecanismo homeostático (Figura 1). A desnutrição protéica promove uma redistribuição funcional das proteínas musculares para disponibilizar nitrogênio necessário para a síntese de proteínas teciduais, formação de células vermelhas e exercer funções imunes. A inter-relação de gordura, músculo e fígado envolve o catabolismo das proteínas musculares e liberação de precursores da neoglicogênese que serão utilizados pelo fígado. Durante esse processo, corpos cetônicos são sintetizados no fígado a partir da gordura e usados como combustível pelo

cérebro e outros órgãos ao invés de glicose (BLACKBURN, 2001).

Metabolismo protéico no músculo esquelético

Síntese Protéica

Uma das principais vias de sinalização de síntese protéica muscular, que é ativada por sinais induzidos por insulina, aminoácidos e exercício de resistência é denominada *Phosphatidylinositol 3-kinase- mammalian target of rapamycin* (PI3K-mTOR) (BOLSTER et al., 2005) (Figura 2).

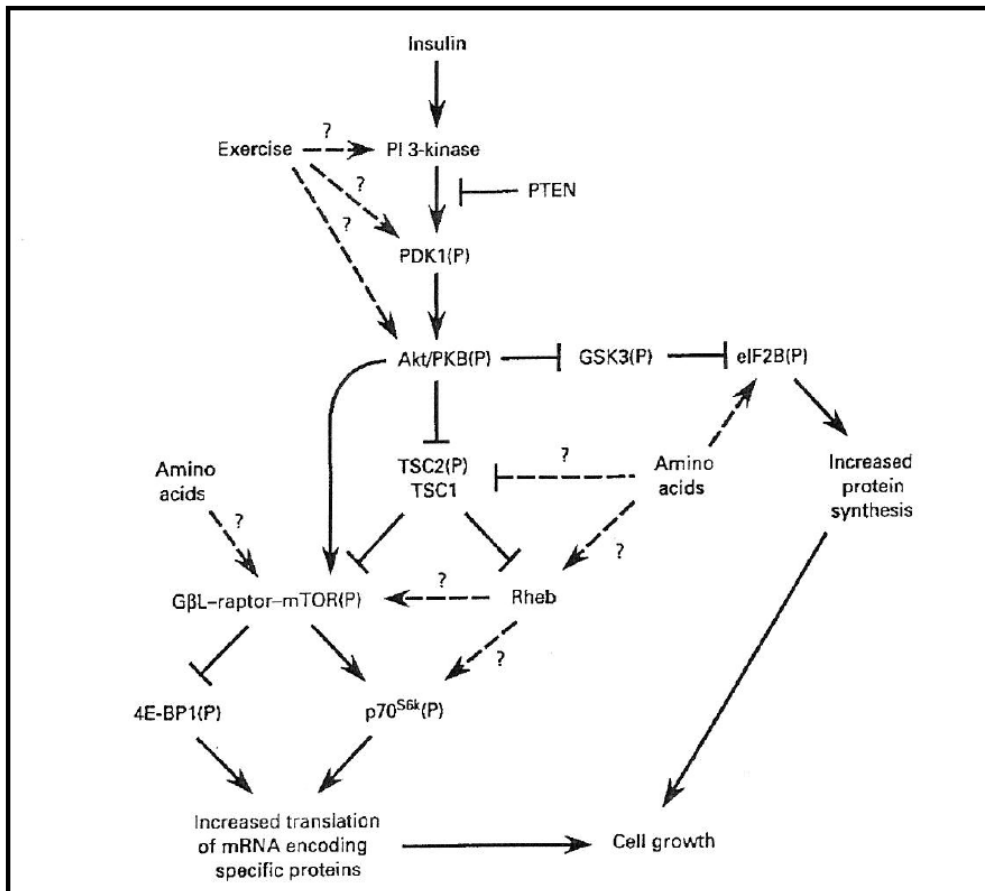


Figura 2. Componentes da via de sinalização de síntese protéica PI3K-mTOR. Insulina, aminoácidos e exercício físico têm-se mostrado responsáveis pela ativação de vários componentes da via de transdução de sinais PI3K-mTOR que promove o aumento da síntese protéica e hipertrofia muscular. (Reproduzida a partir de BOLSTER et al., 2004)

Os mecanismos envolvidos na estimulação da síntese protéica muscular que ocorre em resposta à ativação da via de sinalização PI3K-mTOR podem ser separados em duas categorias temporais: a) mudanças imediatas, isto é, aquelas que ocorrem em menos de uma hora e

que podem ser traçadas para aumentar as taxas de tradução de RNAm mediadas por ativação dos fatores de iniciação de tradução e b) mudanças a longo prazo, ou seja, aquelas que ocorrem após várias horas e que são resultado do aumento do número de ribossomos designados para a tradução de RNAm. Além disso, a sinalização de

Motriz, Rio Claro, v.14, n.1, p.74-84, jan./mar. 2008

mTOR promove transcrição do DNA ribossomal. Juntos, o aumento da tradução de RNAm codificando proteínas ribossomais e o aumento da transcrição de DNA ribossomal promovem a biogênese de ribossomos. Aumento no conteúdo celular de ribossomos é um mecanismo para elevar a capacidade crônica da célula para sintetizar proteína (FINGAR et al., 2002).

Em estudo realizado por Bodini et al. (2001) relacionando síntese protéica no músculo esquelético e exercício de resistência, observou-se que os dados suportam a idéia de que outro componente da cascata quinase, a sinalização de Akt/mTOR, seja ativada e promova a regulação da transcrição de RNAm, causando assim, hipertrofia da musculatura esquelética.

O controle central de mTOR como mediador da resposta hipertrófica sob condições de exercício físico de resistência tem sido verificado através de tratamento *in vivo* com rapamycin (um inibidor específico de mTOR), o qual bloqueia quase que completamente a hipertrofia muscular (REYNOLDS et al., 2002), mostrando assim, a importância da via mTOR na síntese protéica muscular quando da realização de exercício físico.

Contudo, cada uma dessas proteínas pertencentes à via de sinalização PI3K-mTOR (incluindo a proteína Akt) é indispensável para mediar o crescimento da musculatura esquelética e, embora sejam propostas proteínas distintas como potenciais marcadores de hipertrofia muscular, uma resposta coordenada de vias de transdução de múltiplos sinais é essencial para todo o processo (BOLSTER et al., 2004).

Degradação Protéica

Nos últimos anos, os principais mecanismos de degradação protéica ou proteólise foram elucidados. A proteólise muscular ocorre através de vias lisossomal e não lisossomal. A via não lisossomal é controlada pelo sistema ubiquitina-proteossomo, principal responsável na quebra de proteínas miofibrilares e intracelulares de células eucarióticas (TAILLANDIER et al., 2004). A via da ubiquitina é um processo complexo, ativada no músculo durante o catabolismo severo (WRAY et al., 2002). Este processo envolve múltiplos estágios que são proteossomo-dependentes. Incluem a ubiquitinação da proteína a família enzimática ubiquitina E1, E2 e E3 e o proteossomo 26S (ATTAIX, 2001), que

Motriz, Rio Claro, v.14, n.1, p.74-84, jan./mar. 2008

dependem de energia fornecida pelo ATP. Além disso, o proteossomo 26S é um complexo proteolítico que consiste de uma partícula central, o 20S, e subunidade proteossomo adicionada por 2 complexos reguladores, o 19S e o 11S, ambos ligados ao terminal da subunidade 20S (GLICKMAN; CHIECHANOVER, 2002) (Figura 3).

O exercício excêntrico resulta em lesão do músculo esquelético e estimula a proteólise muscular. De acordo com observações feitas em músculos sob condições de perda de massa muscular (i.e. câncer, trauma), o exercício excêntrico aplicado em sujeitos humanos (ação excêntrico-isocinética do bíceps braquial com a mão não dominante ou *leg press* com extensão do joelho) resultou em aumento dos níveis de ubiquitina-proteossomo, detectado através de biópsia muscular (STUPKA et al., 2001). Corroborando tais resultados, as atividades da enzima proteossoma elevaram-se após 14 dias de exercício excêntrico no músculo vasto-lateral de voluntários saudáveis, também determinado através de biópsia muscular.

Por outro lado, o exercício de *endurance* é conhecido por ter efeitos hipertróficos sobre a musculatura esquelética. Kee et al. (2002) reportaram que em músculos incubados, retirados de ratos 24 horas após 5 dias consecutivos de exercício progressivo em esteira rolante, a proteólise é consideravelmente reduzida quando comparada com a de animais não exercitados. Este fenômeno está associado à redução da atividade da quimotripsina do proteossoma e das taxas de ubiquitina-proteossoma dependente da hidrólise de caseína nos músculos extraídos de ratos exercitados comparados com não exercitados. Em outro estudo, Willoughby et al. (2000) observaram, em pacientes com lesão na medula espinhal (caracterizados por apresentarem catabolismo) submetidos a 12 semanas de exercício, de modo passivo, realizado em bicicleta ergométrica, que houve decréscimo da expressão de ubiquitina, da enzima E2 e da subunidade 20S proteossoma. Estes resultados sugerem que a supressão da proteólise através da via ubiquitina-proteossoma, após exercício de *endurance*, pode contribuir para o ganho protéico, de maneira aguda ou crônica, também sob outras condições deletérias ao organismo, como por exemplo, na desnutrição protéico-calórica.

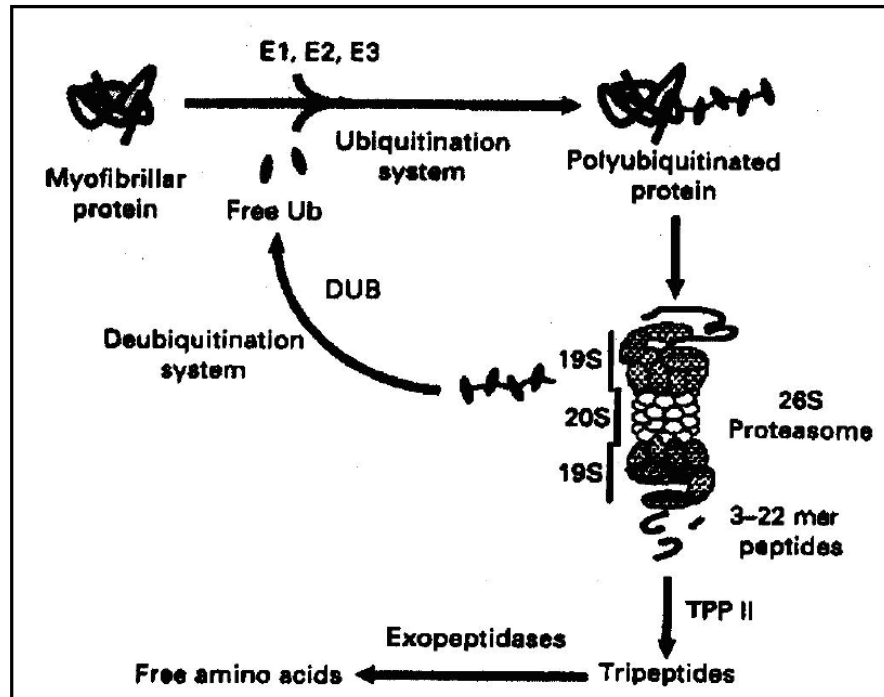


Figura 3. Representação esquemática da via de sinalização de degradação proteica ubiquitina-proteossoma. As enzimas de ubiquitinação, ubiquitina (Ub)- enzima de ativação (E1), Ub-enzima de conjugação (E2) e Ub- proteína ligase (E3) promovem o desenrolamento das proteínas miofibrilares através de um sinal de degradação polyUb. O polyUb se liga ao complexo 19S do proteossomo 26S. ATPases no interior de 19S fornecem energia para o reconhecimento do sinal de degradação polyUb, ocorrendo assim, desdobramento do substrato, abertura dos canais do proteossomo 20S, injeção e progressão do substrato dentro da câmara catalítica do proteossomo 20S, hidrólise proteica e liberação de peptídeos. PolyUb é reciclado em Ub-livres pela atividade de deubiquitinação intrínseca do complexo 19S e/ou pelas enzimas de deubiquitinação (DUB). A hidrólise final dos peptídeos gerada pelo proteossomo 26S em aminoácidos livres é então seqüencialmente executada pela tripeptidil peptidase II (TPP II) e pelas exopeptidases (Reproduzida a partir de TAILLANDIER et al., 2004).

Recuperação nutricional: efeitos do exercício

Sabe-se que a prática regular de atividade física exerce efeitos benéficos para a saúde, tais como aumento da capacidade oxidativa e do crescimento muscular, melhora das condições cardiorrespiratórias e facilitação da mineralização óssea, entre outros (POWERS; HOWLEY, 2000). O exercício pode ser, também, benéfico na recuperação nutricional. Ao serem comparados os ritmos do crescimento de crianças entre dois e quatro anos de idade, enquanto se recuperavam de desnutrição em hospitais, verificou-se que as crianças ativas, que participavam de jogos, envolvendo gasto energético moderado, apresentavam não só massa magra como também tiveram maior crescimento linear do que

quando seguiam o nível de atividade física de rotina dos hospitais (jogos sedentários) (TORUN; VITERI, 1994).

Em animais de laboratório, os efeitos do exercício sobre o crescimento corporal são dependentes das propriedades mecânicas do exercício e da espécie de animais utilizados (BORER, 1979). Os resultados referentes a estudos realizados em modelos animais de má nutrição são conflitantes. Alguns apontam efeitos positivos do exercício sobre o crescimento e o desenvolvimento (GALDINO et al., 2000), enquanto outros trabalhos não encontram qualquer efeito (ZANELATTO et al., 1992). Nesses estudos foram empregadas diferentes espécies de animais, como camundongos (ZANELATTO et al., 1992) e ratos (GALDINO et al., 2000), diferentes procedimentos para

provocar desnutrição, como jejum intermitente (SAKAMOTO; GRUNEWALD, 1987), jejum prolongado e restrição de ingestão protéica (GALDINO et al., 2000, ZANELATTO et al., 1992) e, ainda, diferentes protocolos de atividades físicas, como natação livre (ZANELATTO et al., 1992), natação com sobrecargas de 5% do peso corporal (GALDINO et al., 2000), o que torna difícil a comparação dos resultados.

Existem muitas evidências epidemiológicas de enfermidades crônicas degenerativas ligadas à desnutrição e à concomitante capacidade de proteção fornecida não só por uma alimentação adequada, mas também por hábitos saudáveis e atividade física moderada e rotineira.

Bass et al. (2005), em estudo abordando revisão da literatura sobre desnutrição protéico-calórica (DPC), reportaram que o exercício físico exerce potencial efeito no aumento da força-pico da musculatura esquelética e atuação da mesma sobre o tecido ósseo, o que leva a um aumento proporcional da mineralização e densidade óssea em crianças acometidas pela DPC.

Duran et al. (2005) verificaram, em ratos submetidos à desnutrição protéica pré-natal, que o sistema de atividade neuro-locomotor dos mesmos foi afetado negativamente se comparados a animais controles. Essa ocorrência resultou em comprometimentos motores graves quando esses animais atingiram a idade adulta.

Tamaki et al. (2004) realizaram estudo com ratos acometidos pela desnutrição protéica e submetidos ao treinamento físico de corrida em esteira rolante por 3 semanas. Esses autores verificaram inibição da osteoporose nesses animais (comum nesse tipo de desnutrição), se comparados com ratos também desnutridos, mas mantidos sedentários, pelo não aumento dos níveis da enzima fosfatase alcalina (marcadora bioquímica da incidência de osteoporose).

Mais estudos são necessários a fim de esclarecer melhor os efeitos do exercício físico sobre a recuperação nutricional sob o ponto de vista do tipo de indução da desnutrição e tipo de exercício empregado, onde nesse último tornam-se importantes ergômetro e intensidade utilizados para esse fim.

Referências

ALBANES, S. D.; SALBE, A. D.; LAVANDER, D. A.; TAYLLOR, P. R.; NIXON, D.W.; WINICK, M. *Nutrition*, Rio Claro, v.14, n.1, p.74-84, jan./mar. 2008

The effect of early caloric restriction on colonic cellular growth in rats. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 13, n. ½, p. 73-80, 1990.

ANTOV, A. N. Children born during the siege in Leningrad in 1942. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 30, n. 3, p. 250-259, 1947. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(47\)80160-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(47)80160-X)

ATTAIX, D. Regulation of proteolysis. **Current Opinion of Clinical Nutrition Metabolism Care**, New York, v.4, p. 45-49, 2001. Disponível em: <http://www.clinicalnutrition.com/pt/re/conutrition/abstract.00075197-200101000-00009.htm>; [jsessionid=Lt5RnchJQq0Jg1ZJ1h9ntv3YgnK8rTG87DjJWwJnyHLg3NMTvkJT!-2121125135!181195628!8091!-1](http://www.clinicalnutrition.com/pt/re/conutrition/abstract.00075197-200101000-00009.htm) Acesso em: 31 jan. 2007.

BASS, E. L.; ESER, P.; DALY, R. The effect of exercise and nutrition on the mechanostat. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interact**, Chicago, v. 5, n. 3, p. 239-254, 2005. Disponível em: <http://www.ismni.org/jmni/pdf/21/08BASS.pdf> Acesso em: 31 jan. 2007.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais = Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 5181-5191, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2003000700019>

BEMBEN, A.; KNEHANS, W.; GLORE, S. R. Changes in the plantaris muscle as an indicator of alterations in lean body mass of obese Zucker rats following prolonged energy restriction and subsequent partial recovery. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 277-284, 1997. <http://dx.doi.org/10.1007/s004210050248>

BLACKBURN, G. L. Pasteur's quadrant and malnutrition. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 3, p. 373-378, 2001. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb16111.x> Reprinted by permission from **Nature**, New York, v. 409, p. 397-401, 2001.

BODINI, S. C.; STITT, T. N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W. O.; SDTOVER, G. L.; BAUERLEIN, R.; ZLOTCHENKO, E.; SCRIMGEOUR, A.; LAWRENCE, J. C.; GLASS, D. J.; YANCOPOULOUS, G. D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo*. **Nature Cell Biology**, London, v. 3, p. 1014-1019, 2001. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1101-1014>

F. A. Voltarelli & M. A. R. Mello

- BOLSTER, D. R.; JEFFERSON, L. S.; KIMBALL, S. R. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 63, n. 2, p. 351-356, 2004. <http://dx.doi.org/10.1079/PNS2004355>
- BORER, K. T. Characteristics of growth-inducing exercise. **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 713-720, 1980. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(80\)90402-3](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(80)90402-3)
- BURNS, S. I.; STONE, J.; HOPPER, J. L.; SEEMAN, E. Diet and exercise during growth have site specific skeletal effects: a co-twin control study. **Osteoporosis International**, London, v. 16, n. 10, p. 1225-1232, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-004-1830-z>
- CAPPER, A. Fate and development of the immature and of the premature child: clinical study. **American Journal of Diseases of Children**, New York, v. 35, p. 362-388, 1928.
- CASTRO, J. **Geopolítica da fome**. 7. ed. Rio de Janeiro: Brasiliense, 1965.
- DURAN, P.; CINTRA, L.; CALLER, J. R.; TONKISS, J. Prenatal protein malnutrition induces a phase shift advance of the spontaneous locomotor rhythm and alters the rest/activity ratio in adult rats. **Nutritional Neuroscience**, Oxon, v. 8, n. 3, p. 167-172, 2005. <http://dx.doi.org/10.1080/10284150400026117>
- FERRARI, F.; GABRIELLE, P. R. M.; MELLO, M. A. R. Restrição alimentar durante a gestação e suas implicações sobre o binômio mãe/feto: um modelo experimental utilizando ratas jovens e adultas. **Alimentos e Nutrição**, Campinas, v. 4, p. 45-56, 1992.
- FINGAR, D. C.; SALAMA, S.; TSOU, C.; HARLOW, E.; BLENIS, J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its down-stream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. **Genes & Development**, Chicago, v. 16, n. 12, p. 1472-1487, 2002. Disponível em: <http://www.genesdev.org/cgi/content/abstract/16/12/1472> Acesso em: 31 jan. 2007.
- FOOD AND ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Committee on World Food Security. **Assessment of the world food security situation**. Twenty-Seventh Session, Rome, May 28 - June 1, 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/003/X9563E.htm> Acesso em: 31 jan. 2007.
- GALDINO, R. **Atividade física e ingestão da dieta hipoprotéica durante a gestação em ratas: efeitos sobre a gestante e o desenvolvimento fetal**. 1996. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Motricidade) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1996.
- GALDINO, R.; ALMEIDA, C. C. S.; LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Protein malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to exercise training. **Nutrition Research**, New York, v. 20, n. 4, p. 527, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00144-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00144-5)
- GLICKMAN, M. H.; CHIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction of the sake of construction. **Physiological Reviews**, New York, v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00027.2001>
- GLORE, S. R.; LAYMAN, D. K. Cellular development of skeletal muscle of rats during recovery from prolonged undernutrition. **Journal of Nutrition**, Chicago, v. 117, n. 10, p. 1767-1774, 1987. Disponível em: <http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/117/10/1767> Acesso em: 31 jan. 2007.
- GOMES, F. Desnutrition. **Bulletin Hospital**, Montreal, v. 3, p. 543-551, 1946.
- JELLIFFE, D. B. **The assessment of the nutritional status of the community: with special reference to field surveys in developing regions of the world**. Geneva, World Health Organization, 1966. (Monograph Series. World Health Organization, v. 53)
- KEE, A. J.; TAYLOR, A. J.; CARLSSON, A. R.; SEVETTE, A.; SMITH, R. C.; THOMPSON, M. W. IGF-I has no effect on post exercise suppression of the ubiquitin-proteasome system in rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, New York, v. 92, p. 2277-2284, 2002. <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.01030.2001>
- LATORRACA, M. Q.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; MELLO, M. A. R. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps on insulin action in rats. **Journal of Nutrition**, Chicago, v. 128, p. 16432-1649, 1998. Disponível em: <http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/128/10/1643> Acesso em: 31 jan. 2007.
- MENDONÇA, R. **O paradoxo da miséria**. CSC <http://www.desnutricao.org.br> Acesso em: 1 dez. 2003.
- MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil: implicações para políticas públicas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 17, n. 48, p. 7-20, 2003. Disponível em: http://hygeia.fsp.usp.br/~nupens/monteiro_pobreza_fome.pdf Acesso em: 31 jan. 2007.

Motriz, Rio Claro, v.14, n.1, p.74-84, jan./mar. 2008

- NASCIMENTO, O. J.; MAD, K.; GUEDES e SILVA, J. B.; SOARES FILHO, P. J.; HAHN, M. D.; COUTO, B.; FREITAS, M. R. Striated muscle in protein malnutrition: an experimental study in albino rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 395-402, 1990.
- POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2000.
- REYNOLDS, T.H.; BODINE, S.C.; LAWRENCE, J.C. Control of Ser²⁴⁴⁸ phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 277, n. 20, p. 17657-17662, 2002.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M201142200>
- SAKAMOTO, K.; GRUNEWALD, K. K. Beneficial effects of exercise on growth of rats during intermittent fasting. **Journal of Nutrition**, Chicago, v. 117, n. 2, p. 390-395, 1987. Disponível em:
<http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/117/2/390> Acesso em: 31 jan. 2007.
- SAWAYA, A. L. **Aspects of energy metabolism in protein malnourished rats**. 1985. Thesis (PhD) - Darwin College, Cambridge, 1985.
- SMITH, C. A. Effects of maternal undernutrition upon the newborn infant in Holland (1944-5). **Journal of Pediatric**, Chicago, v. 29, p. 517-534, 1947.
- STEWART, J. C.; PRECE, R. F.; SHEPPARD, H. G. Twelve generation of marginal protein deficiency. **British Journal of Nutrition**, London, v. 33, p. 233-253, 1975.
- STUPKA, N.; TARNOPOLSKY, M. A.; YARDLEY, N. J.; PHILIPS, S. M. Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. **Journal of Applied Physiology**, New York, v. 91, p. 1669-1678, 2001. Disponível em:
<http://jap.physiology.org/cgi/content/abstract/91/4/1669> Acesso em: 31 jan. 2007.
- TAILLANDIER, D.; COMBARET, L.; POUCH, M. N.; SAMUELS, S. E.; BÉCHET, D.; ATTAIX, D. The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 63, p. 357-361, 2004.
<http://dx.doi.org/10.1079/PNS2004358>
- TAMAKI, H.; SUN, L.; OHTA, Y.; KATSUYAMA, N.; ISHIMARU, T.; CHINEN, I. Running inhibits osteoporosis induced by protein-deficient (PD) in food intake. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 68, n. 7, p. 1578-1580, 2004. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.68.1578>
- 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, 1994. v. 2, p. 950-976. Disponível em:
<http://books.google.com/books?id=S5oCjZZZ1gg&hl=pt-BR> Acesso em: 31 jan. 2007.
- TORUN, B.; VITERI, F. Influence of exercise on linear lactate. **European Journal of Clinical Nutrition**, Memphis, v. 48, n. 1, p. 5186-5190, 1994.
- VENTRUCI, G.; SILVA, L. G. R.; MELLO, M. A. R.; MARCONDES, M. C. C. G. Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats. **Nutrition**, New York, v. 20, n. 2, p. 213-217, 2004.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2003.10.014>
- WILLOUGHBY, D. S.; PRIEST, J. W.; JENNINGS, R. A. Myosin heavy chain isoform and ubiquitin protease mRNA expression after passive leg cycling in persons with spinal cord injury. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Chicago, v. 81, p. 157-163, 2000.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9993\(00\)90134-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9993(00)90134-5)
- WINICK, M.; BASEL, J. A.; ROSSO, P. Nutrition and cellular growth. In: WINICK, M. **Nutrition and development**. New York: John Wiley, 1972. p. 49-97.
- WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 89, n. 3, p. 300-306, 1966. Disponível em:
<http://jn.nutrition.org/cgi/content/abstract/89/3/300> Acesso em: 31 jan. 2007.
- WRAY, C. D.; MAMMEN, J. M.; HASSELGREEN, P. O. Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. **Nutrition**, New York, v. 18, n. 11/12, p. 971-977, 2002.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00985-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00985-1)
- ZANELATTO, R. A.; FERRARI, F.; MELLO, M. A. R. Desnutrição protéico-calórica e crescimento corporal. Influência do exercício na recuperação nutricional de ratos. **Alimentos e Nutrição**, Campinas, v. 8, p. 7-16, 1992.

Agradecimento

Os autores fazem um agradecimento especial à *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo apoio financeiro ao presente trabalho.

10.2- Apresentação do artigo científico em Inglês, derivado da presente Tese de Doutorado, Publicado no periódico European Journal of Nutrition (Fator de Impacto: 2,098) (2008). Encontra-se em anexo, também, o *ABSTRACT*, referente ao mesmo estudo, publicado na Edição Especial do periódico *Medicine & Science and Sports & Exercise*, apresentado pelo aluno na forma de *Slide Session (Oral)* no ACSMs 55th Annual Meeting, Indianápolis, EUA – 2008.

VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R. *Spirulina enhanced the skeletal muscle protein in growing rats.*

Fabrício A. Voltarelli
Maria Alice R. de Mello

Spirulina enhanced the skeletal muscle protein in growing rats

Received: 9 October 2007
Accepted: 9 September 2008
Published online: 18 September 2008F.A. Voltarelli (✉) · M.A.R. de Mello
Dept. of Physical Education
UNESP-São Paulo State University
24-A Avenue, number 1515-District:
Bela Vista
13506-900 Rio Claro (SP), Brazil
Tel.: +55-19/3526-4100
Fax: +55-19/3526-4321
E-Mail: faunesp8@yahoo.com.br

■ **Abstract** *Background/Aim of the study* This study evaluates the effects of the blue green alga *spirulina* as the sole dietary source of protein on muscle protein in weaning rats. *Methods* Young (30 days) Wistar rats were fed, during 60 days, with 17% protein *spirulina* (S) and compared to rats fed 17% protein casein (C). We evaluated the muscle total protein and DNA contents and the in vitro protein synthesis and degradation rates as well the myosin protein expression. *Results* The groups presented similar body weight ($C = 427.3 \pm 8.6$; $S = 434.6 \pm 7.7$ g) and length ($C = 25.4 \pm 0.2$; $S = 25.6 \pm 0.2$ cm). Soleus muscle total protein ($C = 2.9 \pm 0.1$; $S = 2.7 \pm 0.1$ mg/100 mg) and

DNA ($C = 0.084 \pm 0.005$; $S = 0.074 \pm 0.005$ mg/100 mg) contents were also similar in both groups. Protein degradation ($C = 427.5 \pm 40.6$; $S = 476.7 \pm 50.5$ pmol/mg⁻¹ h⁻¹) did not differ between the groups but protein synthesis ($C = 17.5 \pm 1.0$; $S = 25.2 \pm 1.9$ pmol/mg⁻¹ h⁻¹) and myosin content (western blot analyses) were higher ($P < 0.05$, *t* test) in *spirulina* group. *Conclusions* Although the *spirulina* proved adequate protein quality to maintain body growth, the muscle protein synthesis rates were increased by the ingestion of the experimental diet in young rats.

■ **Key words** skeletal muscle – *spirulina* – protein

Introduction

The use of algae (seaweed) in human alimentation is ancient. In the East, in particular, such source of food material have been tried extensively, in the hope of correcting the widespread protein deficiency that characterizes the nutritional status of less favored populations [22, 41]. To this day, with the continuing low level of available protein food all over the world and increasingly urgent need for low-cost food of good nutritional value, the exploration of seaweed biomasses as food sources is a matter of generalized interest.

Spirulina is a helicoidal shaped blue green alga with length of 0.2–0.3 mm [8, 19]. *Spirulina*'s special merit as a food source is that it contains 65–70% protein on dry weight basis, which is higher than any other natural food and has all eight essential amino acids to men [26]. It normally grows in naturally alkaline lakes located in arid zones. Although the alkaline water from such lakes cannot be used for irrigation, it can be used for cultivation of *spirulina* [22, 41]. Since this alga has a rapid reproduction rate, dividing three times a day, a pond devoted totally to the growth of *spirulina* can produce 125 times as much protein as the same amount area devoted to

EN 740

corn, 70 times as much protein as to fish and 600 times as much as cattle [5, 16].

According to previous evaluations, *spirulina* seems to be a good alimentary protein source for human subjects. It has adequate acceptance and does not appear to exert any toxic effects, although it has slightly reduced digestibility [37, 40]. The most detailed studies on the nutritional value of *spirulina* have been conducted in rodents, mostly rats. The rodent studies covered a variety of parameters, such as body growth [7, 28, 36, 45], protein efficiency ratio (PER) and net protein utilization (NPU) [3, 31], sexual maturation [7], reproductive performance [36], hematological status [21], toxicity [6, 36, 45], among others. *Spirulina* proved adequate to maintain all these physiological makers at normal levels and did not produce adverse effects after chronic treatment. However, to the author's knowledge, there is little information about the effects of *spirulina* on tissues with high metabolic rates, such as skeletal muscle, examined at cellular and molecular levels.

The present study was designed to evaluate the effects of *spirulina* as the sole dietary source of protein in weaning rats on protein synthesis and degradation rates and myosin protein expression in skeletal muscle.

Experimental methods adopted

■ Animals and diets

All experiments involving animals followed the specific Brazilian resolutions of the Bioethics of Experiments with Animals (law No. 6.638 of 8 May 1979; Decree No. 24.645 of 10 July 1934, Brazilian College of Animal Experimentation). Young (30 days old at the start of the experiment) male Wistar rats, weighing 131.1 ± 22.1 g and measuring (nose-to-anus length) 20.6 ± 1.3 cm, were obtained from the animal facilities of the UNESP, Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil, and were randomly separated and maintained on an isocaloric powdered protein free diet plus *spirulina* (powdered *Spirulina maxima* sold commercially by All Chemistry do Brasil Ltda.) or a powdered protein free diet plus casein (powdered milk protein) until the adult age (90 days old). The casein diet contained 17% protein (casein), 64% carbohydrate, 7% fat, 5% fiber and was complemented with a mineral mix and a vitamin mix, in accordance to the AIN-93 [35]. *Spirulina* diet contained the same amount of protein, carbohydrate, fat and fiber as the casein diet but casein was replaced by *spirulina* as protein source. The total protein content in both diets

Table 1 Diets composition (g/kg)

Components	Casein 17% ^a	<i>Spirulina</i> 17%
<i>Spirulina</i> (65% protein) ^b	–	280.0
Casein (84% protein) ^c	202.2	–
Cornstarch	397.0	386.0
Dextrinized cornstarch	130.5	130.5
Sucrose	100.0	100.0
Soybean oil	70.0	70.0
Fiber (microcellulose)	50.0	50.0
Mineral mix	35.0	35.0
Vitamin mix	10.0	10.0
L-cystine	3.0	3.0
Choline hydrochloride	2.5	2.5

^aIn accordance to the diet for growth phase, pregnancy and lactation of rodents, AIN-93G [35]

^bCorrected values for the protein content in *spirulina* [1]

^cCorrected values for the protein content in casein [1]

was assessed and corrected by Kjeldahl nitrogen assay [1]. The mineral and vitamin mix composition were corrected for the mineral and vitamin contents in the *spirulina* powder. Details of the composition of both diets are described on Table 1.

The *spirulina* powder composition was as follows. General analysis (%): protein 64.7, carbohydrates 15, lipids 6, minerals (ash) 7, fiber 8. Minerals (mg/10 g): calcium 70, iron 15, phosphorus 80, magnesium 40, zinc 0.3, manganese 0.5, sodium 90, potassium 140; minerals (mcg/10 g): selenium 10, copper 120, chromium 25. Vitamins (per 10 g): vitamin A 23,000 IU, beta carotene 14 mg, vitamin D 1,200 IU, vitamin E 1.0 mg, vitamin K 200 mcg, biotin 0.5 mcg, inositol 6.4 mg, thiamine 0.35 mg, riboflavin 0.4 mg, niacin 1.4 mg, pyridoxine 80 mcg, folate 1 mcg, cianocobalamine 20 mcg, pantothenic acid 10 mcg. Essential amino acids (mg/10 g): isoleucine 350, leucine 540, lysine 290, methionine 140, phenylalanine, 280, threonine 320, tryptophan 90, valine 400. Non essential amino acids (mg/10 g): alanine 470, arginine 430, aspartic acid 610, cystine 60, glutamic acid 910, glycine 320, histidine 100, praline 270, serine 320, tyrosine 300. Total amino acids (g/10 g): 6.2.

During the experiment, the rats had free access to food and water and were housed on a 12 h light/dark cycle at room temperature of 25°C. Food intake was monitored daily and body weight and length were measured (nose-to-anus length) once a week.

■ Tissue extraction

At the end of the experimental period, all animals were killed by decapitation. Blood samples were collected for serum glucose, total protein, albumin

and free fatty acid (FFA) levels measurements [32]. Samples of the liver were taken for total lipid [32], total protein [27] and DNA [18] determinations. Samples of the right gastrocnemius muscle were collected for total protein content and chymotrypsin-like and alkaline phosphatase activities assays and for myosin protein expression by western blot analysis. Left soleus muscle was also excised, weighed and analyzed for total protein and DNA contents and for myosin protein expression by western blot analysis. Longitudinal strips (70 mg) from the right soleus muscle were obtained for protein synthesis and degradation assays. The carcass was eviscerated, weighed and dried to constant weight in an oven at 100°C. It was then homogenized in a blender with benzene and extracted with several more changes of benzene. The powder was dried in the oven and weighed. Water and fat contents were calculated by difference. The dry fat-free powder was dissolved in HClO₄ 1 N and protein content was then measured [27].

■ Protein synthesis

The soleus muscle strips were preincubated for 30 min in RPMI 1640 medium (with glutamine and without red phenol and sodium bicarbonate), supplemented with bovine serum albumin fatty acid free (BSA) [1 g/l] and insulin [100 U/ml], saturated with 95%O₂/5%CO₂ gas mixture. They were then transferred into a fresh RPMI 1640 medium with the same supplementation containing 14-C phenylalanine [0.05 µCi/ml] and incubated for 2 h. At the end of the incubation, the muscle strips were homogenized in 5% trichloroacetic (TCA) and centrifuged at 2,000 rpm for 15 min at 4°C. TCA-insoluble material was washed three times with 5% TCA. The resultant pellet was solubilized in 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) at room temperature for 30 min for determination of protein content and radioactivity incorporated to muscle proteins. Muscle protein was determined by the folinphenol method [27] and the protein-bound radioactivity was measured using scintillation counting. Protein synthesis was calculated by dividing the protein-bound radioactivity by the specific activity of the free phenylalanine in the incubation medium and expressed as nanomoles of phenylalanine incorporated per milligram of protein per 2 h.

■ Protein degradation

Tyrosine release from isolated muscle in presence of cyclohexamide was used as indicator of protein deg-

radation as previously described by Fulks et al. [15]. This method makes use of the fact that the amino acid tyrosine is neither synthesized nor degraded by skeletal muscle. The soleus muscle strips were preincubated for 30 min in Krebs Ringer buffer [NaCl 1.2 mmol/L; KCl 4.8 mmol/L; NaHCO₃ 25 mmol/L; CaCl₂ 2.5 mmol/L; kH₂PO₄ 1.2 mmol/L and mgSO₄ 1.2 mmol/L; ph 7.4], supplemented with glucose [5.5 mmol/L], BSA [1.0 g/l], insulin [5 U/ml] and cyclohexamide [5 mmol/L], saturated with 95%O₂/5%CO₂ gas mixture. They were then transferred into fresh medium of the same composition and incubated for 2 h. At the end of the incubation, samples of the incubation medium were used for the assay of tyrosine by the procedure of Waalkes e Udenfriend [46].

■ Western blotting analysis

The gastrocnemius muscles were homogenised in homogenising buffer (HB) (20 mmol/L Tris, 1 mM dithiothreitol, 2 mmol/L ATP and 5 mmol/L MgCl₂) and centrifuged at 15,000g for 15 min at 4°C. The resulting supernatant was analyzed for total protein content [4].

The protein samples of gastrocnemius muscle (5 µg) were resolved on 12% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels, and transferred to 0.45 µm nitrocellulose membranes (Hybond-C, Amersham, UK) and blocked with 5% Marvel in PBS buffer saline, 0.1% tween, pH 7.5. Myosin antibody (Novocastra, New Castle, England) was used at 1:250 dilution and the secondary antibody, rabbit anti-mouse, was conjugated horseradish peroxidase, and was used at 1:1,500 dilution. Actin was used as the loading control, after probing the mouse actin antibody. The band expression was developed using ECL chemiluminescence (Amersham, UK). The blots were scanned by densitometry to quantify the differences using Gel Pro Analyser software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

■ Enzyme activity analysis

The enzyme *chymotrypsin-like* and alkaline phosphatase activities of the muscles were measured. Chymotrypsin-like activity was determined using the fluorogenic substrate succinyl-Leu-Leu-Val-Try-7-amino-4-methylcoumarin (Suc LLVY-AMC; 0.167 mg/ml in 100 mmol/L Tris-HCl, pH7.4; excitation 360 nm, emission 460 nm). The activity was expressed as units of fluorescence per microgram of protein, as a percentage of the control group. Alkaline phosphatase activity was measured using 37 mM *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP) as substrate, and activity was ex-

Table 2 Body weight (g) and body length (cm) at the end of the experiment and food intake (g/100 g of body weight) during the experiment

	Casein	<i>Spirulina</i>
Body weight	427.3 ± 8.6	434.6 ± 7.7
Body length	25.4 ± 0.2	25.6 ± 0.2
Food intake	8.5 ± 0.1	7.9 ± 0.2

Results expressed as mean ± SEM of 14 rats in each group

Table 3 Carcass water (g/100 g), fat (g/100 g) and protein (g/100 g) contents at the end of the experiment

	Casein	<i>Spirulina</i>
Water	61.5 ± 1.0	59.6 ± 2.0
Fat	20.3 ± 1.3	20.8 ± 0.7
Protein	13.1 ± 0.7	12.8 ± 0.8

Results expressed as mean ± SEM of 7 rats in each group

pressed in nanomoles of nitrophenol formed per microgram of muscle protein [29].

Statistical analysis

The results were expressed as mean ± SEM for the number of rats (*n*) indicated. When working with soleus muscle strips, *n* refers to the number of strips used. The data were analyzed by Student's unpaired *t* test and *P* values <0.05 were considered to indicate significant difference.

Results

After 8 weeks of diet treatment, there were no differences between casein and *spirulina* fed rats in body weight, body length, food intake (Table 2) and carcass composition (Table 3). Serum total protein, albumin, glucose and FFA levels were also similar in the two groups (Table 4). Liver (Table 5) and soleus (Table 6) muscle weight, total protein and DNA contents and protein/DNA ratio did not differ between the groups. The muscle cellular activity, as analyzed by the alkaline phosphatase activity in gastrocnemius muscle, was similar in both groups ($C = 11.78 \pm 1.02$; $S = 10.49 \pm 0.69$ nmol μg protein⁻¹). The protein degradation rates and the *chymotrypsin-like* activity (which represents the catalytic portion of the proteasome system) in soleus and gastrocnemius muscles, respectively, were similar in both groups (Fig. 1a, b) whereas the muscle protein synthesis rates (soleus) and myosin content (gastrocnemius) (the protein expression and the densitometric analysis) were sig-

Table 4 Serum protein (g/dl), albumin (g/dl) glucose (mg/dl) and free fatty acids (FFA, in $\mu\text{Eq/l}$) concentrations at the end of the experiment

	Casein	<i>Spirulina</i>
Protein	7.3 ± 0.1	7.1 ± 0.2
Albumin	3.6 ± 0.3	3.4 ± 0.1
Glucose	119.5 ± 9.3	114.8 ± 9.1
FFA	490.0 ± 42.3	440.0 ± 26.9

Results expressed as mean ± SEM of 7 rats in each group

Table 5 Liver weight (g/100 g of body weight) and total protein (g/100 g), DNA (g/100 g); protein to DNA ratio and total fat (g/100 g) contents at the end of the experiment

	Casein	<i>Spirulina</i>
Weight	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1
Total protein content	2.9 ± 0.3	2.6 ± 0.1
DNA content	0.125 ± 0.01	0.113 ± 0.005
Protein/DNA	24.1 ± 2.6	23.2 ± 2.1
Total fat	6.7 ± 0.5	6.6 ± 0.3

Results expressed as mean ± SEM of 7 rats in each group

nificantly higher in *spirulina* fed rats compared to casein group (Fig. 2a, b, c, respectively).

Discussion

The nutritional status of the animals fed casein or *spirulina* was analyzed by measuring the body weight and length and serum total protein and albumin levels, which are the traditional nutritional assessment indices for human subjects [35] and also frequently used in animal studies [12, 13, 33]. The present study showed that feeding the rats a *spirulina* protein diet from weaning until adult age led to a similar body weight and length gain as the control group. Equally, these findings agree with previous observations that *spirulina* as the sole protein source in the diet allows normal growth in rats [6, 7, 36, 45]. The food intake of the animals on the *spirulina* diet was slightly lower compared to the casein diet; however, this difference was not significant. A similar observation was also noted by Tranquille et al. [45] and Chen and Pan [6] in

Table 6 Soleus muscle weight (g/100 g of body weight); total protein (g/100 g) and DNA (g/100 g) contents; and protein to DNA ratio at the end of the experiment

	Casein	<i>Spirulina</i>
Weight	0.053 ± 0.003	0.054 ± 0.002
Total protein content	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.1
DNA content	0.084 ± 0.005	0.074 ± 0.005
Protein/DNA	34.4 ± 2.5	33.9 ± 3.9

Results expressed as mean ± SEM of 7 rats in each group

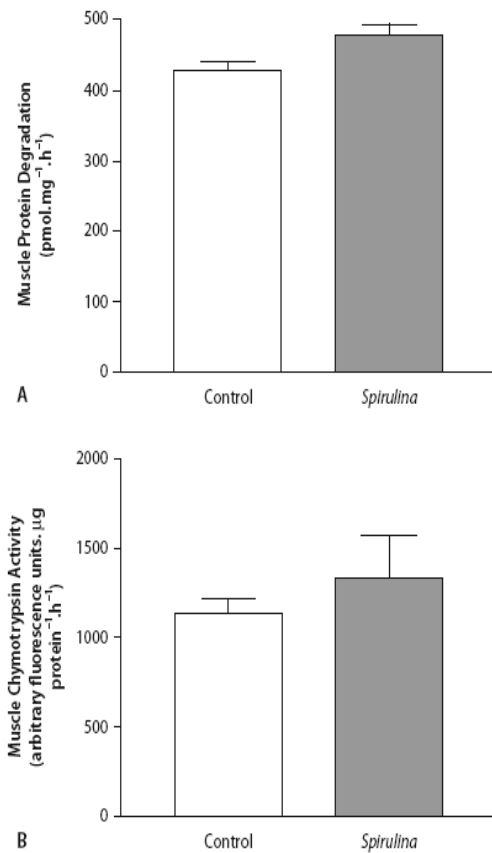


Fig. 1 Effects of *spirulina* diet on soleus muscle protein degradation (pmol/mg⁻¹ h⁻¹) (a) and the gastrocnemius muscle *chymotrypsin-like* activity (arbitrary fluorescence units, μg protein⁻¹ h⁻¹) (b) in weaning rats fed with casein (C) and *spirulina* diet (S), during 60 days. The results were expressed as mean ± SEM of 13 muscle strips in each group. *Significantly different ($P < 0.05$, *t* test) from casein group

their feeding studies. Serum proteins, especially serum albumin levels, are among the most extensively studied physiological markers. Several studies have demonstrated that a low serum albumin is associated with medical complications [20], including protein malnutrition [44]. No differences were observed in total protein and albumin levels between casein and *spirulina* rats. In addition, *spirulina* fed rats did not show other characteristics commonly found in infantile [44] and animal [33] protein malnutrition as hypoglycemia, fatty liver and elevated serum FFA concentrations. Together, these results suggest that feeding *spirulina* as the sole protein source in the diet did not induce signs of protein malnutrition in the rats.

According to Winick et al. [47], the total number of cells in an organ can be estimated, for practical purposes, by determining total organ DNA content and the cell size can be estimated by calculating the weight/DNA ratio or the protein/DNA ratio [47]. In

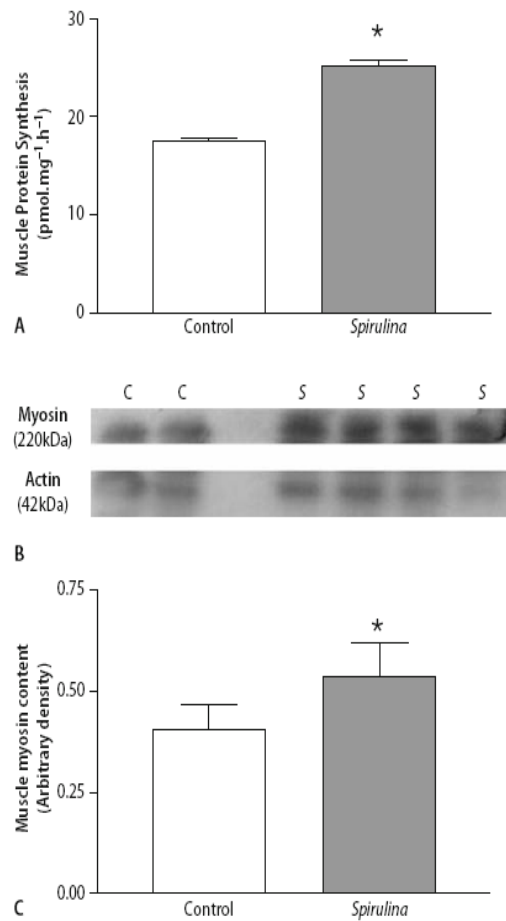


Fig. 2 Effects of *spirulina* diet on soleus muscle protein synthesis (pmol/mg⁻¹ h⁻¹) (a) and the western blot image of the myosin and actin of the gastrocnemius muscle (b) and densitometry analysis (arbitrary densitometric units) (c) in weaning rats fed with casein (C) and *spirulina* diet (S), during 60 days. Arbitrary densitometric values of myosin expression are analyzed for eight individual western blotting. Actin was used as a loading control, and there was no difference between the groups. The results were expressed as mean ± SEM of 13 muscle samples from each group. *Significantly different ($P < 0.05$, *t* test) from casein group

rats, organ weight and protein continue to increase (hypertrophy) until about 100 days of age. By contrast, DNA (hyperplasia) reaches a maximum before this in most organs [47]. In skeletal muscle fiber, DNA reaches a maximum at about 90 days of age whereas weight and protein increment continues to approximately 140 days. Nutritional alterations during the period of hyperplastic and/or hypertrophic growth may result in altered number and/or size of cells in this tissue. According to the same authors [47], the additional measurement of total muscle mass may give further important information regarding the effects of the nutritional stress on muscle growth. Taken

together, our observations on muscle weight and protein and DNA contents indicate that *spirulina* as the sole dietary protein source did not impair neither hyperplastic nor hypertrophic growth in skeletal muscle in the young rat.

To further analyze the consequences of long term of *spirulina* protein ingestion on muscle protein we evaluated, in vitro, protein synthesis and degradation rates in the soleus muscle as well as myosin expression and chymotrypsin-like activity in the gastrocnemius muscle.

Incubated soleus muscle strips showed negative protein balance, even in presence of insulin, as demonstrated previously in incubated mouse extensor digitorum longus muscle [EDL] [43]. Despite of this fact, incubated EDL was considered a sensitive preparation to in vivo alterations of protein metabolism by nutrients [43]. It was demonstrated that the cutting the soleus muscle significantly increased protein degradation rates compared to uncut counterparts [38]. However, a single cut, one-half way through the soleus muscle, procedure adopted in the present study, did not significantly alter these rates. At least two cuts through the muscle were necessary to significantly increase the rates of protein degradation [38]. Oxygen diffusion may be improved in incubated muscles by increasing the resting tension during the incubation, which creates a thinner muscle bundle, favoring muscle anabolism. In fact, the protein balance was improved in some studies by increasing the resting tension in the muscle during incubation [2] but not in others [14]. In previous studies performed in our laboratory, where aspects of glucose metabolism in the incubated soleus muscle were evaluated, the results were not altered by the degree of tension to which the muscles were submitted during incubation [42]. On the other hand, others [38] demonstrated an increase in high-energy phosphates in the soleus muscles with the increase of the degree of tension during the incubation.

Protein degradation rates in incubated soleus muscle were similar in groups and the *chymotrypsin-like* activity, pertaining to the catalytic ubiquitin-proteasome system pathway, the main pathway for protein degradation [9], evaluated in the gastrocnemius muscle, did not show any difference between the groups. In this sense, these in vitro results suggested *spirulina* had no spoil effect on muscle proteolysis, as expected in protein-malnourished or in cachetic states. On the other hand, the protein synthesis rates in the soleus muscle were higher in *spirulina* fed rats, as well as the myosin content in the gastrocnemius muscle.

Protein synthesis and degradation assays were performed in vitro in presence of insulin, a hormone which participates in the stimulation of muscle pro-

tein synthesis, especially in young growing animals [17]. It was demonstrated that the dietary protein level affects insulin sensitivity to glucose in the rat skeletal muscle as a result of alterations in the early steps of the signal transduction pathway, including the insulin receptor (IR) levels; the lower the dietary protein content, the greater the insulin sensitivity to glucose [25]. No evaluations were made on the effects of dietary protein quality on muscle insulin sensitivity to glucose or other nutrients. Amino acids also play an important role in regulating muscle protein synthesis [11] and this modulation may be affected by dietary protein quantity or quality. It may be hypothesized that the increase in the muscle protein synthesis and myosin expression observed in the *spirulina* fed rats might be a consequence of an alteration in the signaling cascades responsible for the insulin and/or amino acid-induced stimulation of protein synthesis in skeletal muscle, since the *spirulina* diet composition has slightly higher branched-chain amino acid amount than casein diet composition. In this sense, an interesting step to be investigated is the role of mTOR pathway in mediating the observed effects.

It is known that fatty acids can affect muscle protein synthesis. In an interesting study [23], the effects of elevated circulating lipids on protein synthesis of chronically catheterized conscious rats were verified. The short-term elevation of plasma FFAs by a 5-h infusion of heparin plus Intralipid decreased muscle protein synthesis by approximately 25% under basal conditions. Therefore, another aspect that deserves further investigation is the effect of the free fatty acids contained in *spirulina* on muscle protein metabolism.

The results of the present study suggest certain caution about the nutritional value and safety of *spirulina* as protein source. The nutritional value of this protein is demonstrated by the adequate body growth and the absence of biochemical abnormalities in the tissues of the rats fed the experimental diet. However, there was one finding indicative of alteration in muscle protein: the increased protein synthesis observed in isolated soleus muscle.

An important question emerged from the results of the present study: if protein synthesis rates are higher in the *spirulina* fed group, without alteration in degradation rates, there should be expected differences in body growth and weight between the *spirulina* and the casein groups, which were not observed. Although the total carcass protein content was also similar between the two groups, in previous studies we also showed increase in protein synthesis and myosin content in response to branched-chain amino acids induced cell signaling. This point worth, to be evaluated in nearly future. Unfortunately, for the present work the nitrogen balance was not determined, which might be

of importance in evaluating the biological value of dietary *spirulina* protein. Even though, the present results showed particular effect of *spirulina* diet on protein synthesis. Further studies are now underway in our laboratory to determine and clarify the mech-

anisms involved in the effects of dietary *spirulina* protein on skeletal muscle protein.

■ **Acknowledgments** The authors want to thank the Brazilian Foundation *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* for financial support.

References

- Albanese AA, Orto, LA (1963) Protein and amino acids. In: Albanese AA (ed) *Newer methods of nutritional biochemistry*. Academic Press, New York, vol I. cap. 1, 84
- Arvill A, Adolfsson S, Ahre'n K (1975) The use of the levator ani muscle in vitro in evaluating hormone action. *Methods Enzymol* 39:94-101
- Bourges H, Sotomayor A, Mendonza E, Chavez A (1971) Utilization of the *spirulina* as a protein source. *Nut Rep Int* 4(1):31-42
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7(72):48-54
- Branger B, Cadudal JL, Delobel M, Ouoba H, Yameogo P, Ouedraogo D (2003) Spiruline as a food supplement in case of infant malnutrition in Burkina-Faso. *Arch Pediatr* 10(5):424-431
- Chen H, Pan SS (2005) Bioremediation potential of *spirulina*: toxicity and biosorption studies of lead. *J Zhejiang Univ Sci B* 6(3):171-174
- Contreras A, Herbert DC, Grubs BG, Cameron IL (1979) Blue alga *spirulina* as the sole dietary source of protein in sexually maturing rats. *Nut Rep Int* 19(6):749-763
- Costa DA, De Morais MG, Dalcato F, Reichert C, Durante AJ (2006) Simultaneous cultivation of *spirulina* plantensis and the toxigenic cyanobacteria *microcystis aeruginosa*. *Z Naturforsch* 61(1-2):105-110
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann Rev Biochem* 65:801-847
- Danzi S, Klein I (2005) Posttranscriptional regulation of myosin heavy chain expression in the heart by triiodothyronine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(2):H455-H460
- Dardevet D, Somet C, Balage M, Grizard J (2000) Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *J Nutr* 130:2630-2635
- Deming C, Block F, Picard N, Sabboh H, Besson C, Remesy C (2007) Mice chronically fed a westernized experimental diet as a model of obesity, metabolic syndrome and osteoporosis. *Eur J Nutr* 45(5):298-306
- Desai M, Crowter NJ, Lucas A, Hales CN (1996) Organ selective growth in the offspring of protein restricted mothers. *Br J Nutr* 76:591-603
- Frayn KN, Maycock PF (1979) Regulation of protein metabolism by a physiological concentration of insulin in mouse soleus and extensor digitorum longus muscle. *Biochem J* 184:323-330
- Fulks RM, Li JB, Goldberg JL (1975) Effects of insulin, glucose, amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J Biol Chem* 250:290-298
- Furst PT (1978) *Spirulina*-nutritious alga, once a staple of Aztec diets could feed many of the world's hungry people. *Hum Nat* 3:60-71
- Garlick PJ, Grant I (1988) Amino acid infusion increases the sensitivity of protein synthesis to insulin. Effects of branched chain amino acids. *Biochem J* 254:579-584
- Giles A, Meyers A (1961) An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 206(1 n. 4975):93
- Hadenshog G, Hofsten A (1979) The ultra structure of *spirulina* plantensis. A new source of microbial protein. *Physiol Plant* 23:209-216
- Jeejeebhoy KN (2000) Nutritional assessment. *Nutrition* 16(7/8):585-590
- Kapoor R, Metha U (1998) Supplementary effect of *spirulina* on hematological status of rats during pregnancy and lactation. *Plant Foods Hum Nutr Aliment* 29(6):517-534
- Kay RA (1991) Micro algae as food and supplement. *Crit Rev Food Sci Nutr* 30(6):555-573
- Lang CH (2006) Elevated plasma free fatty acids decrease basal protein synthesis, but not the anabolic effect of leucine, in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(3):E666-E674
- Larbaud D, Debras E, Taillandier D, Samuels SE, Temparis S, Champredon C, Grizard J, Attaix D (1996) Euglycemic hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia decrease skeletal muscle ubiquitin mRNA in goats. *Am J Physiol* 271:E505-E512
- Latorraca MQ, Reis MB, Carneiro EM, Mello MAR, Velloso LA, Saad MJ, Boschero AC (1998) Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and early steps of insulin action in rats. *J Nutr* 128:1643-1649
- Li ZY, Guo SY, Li L, Cai MY (2006) Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *spirulina* plantensis in an air-lift photobioreactor. *Bioresour Technol* 98(3):700-705
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RT (1951) Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Maranesi M, Barzanti V, Carenini G, Gentile P (1984) Nutritional studies on *spirulina* maxima. *Acta Vitaminol Enzymol* 6(4):295-304
- Martins MJ, Negrao MR, Hipolito-Reis C (2001) Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. *Clin Biochem* 34:463-468
- Mello MAR, Luciano E, Carneiro EM, Latorraca MQ, Oliveira CAM, Boschero AC (2003) Glucose homeostasis in pregnant rats submitted to dietary protein restriction. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 113-114:229-246
- Narayan MS, Manoj GP, Vatchravelo K, Bhagralakshmi N, Mahadevaswamy M (2005) Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *spirulina* plantensis. *Int J Food Sci Nutr* 56(7):521-528
- Nogueira DM, Strufaldi B, Hirata M, Abdalla DS, Hirata RD (eds) (1990) *Métodos de Bioquímica Clínica*, São Paulo, Pancas Editorial
- Prada FJ, Luciano E, Carneiro EM, Boschero AC, Mello MAR (2001) Protein deficiency attenuates the effects of alloxan on insulin secretion on glucose homeostasis in rats. *Physiol Chem Phys Med NMR* 33:73-82

34. Proud CG (2006) Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans* 34(2):213–216
35. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final reports of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr* 123:1939–1951
36. Salazar M, Chamorro GA, Salazar S, Steele CE (1996) Effects of *spirulina* maxima consumption on reproduction and peri and post natal development in rats. *Food Chem Toxicol* 34(4):353–359
37. Sautier C, Tremolieres J (1975) Food value of the *spirulina* algae to man. *Ann Nutr Aliment* 29(6):517–534
38. Seider MJ, Kapp R, Cheg CP, Booth FW (1980) The effect of cutting or stretching skeletal muscle in vitro on the rates of protein synthesis and degradation. *Biochem J* 188:247–254
39. Silva RG, Almeida CCA, Luciano E, Mello MAR (2000) Protein malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to exercise training. *Nutr Res* 20(4):527–535
40. Simpre J, Zongo F, Kabore F, Dansou D, Bere A, Nikiema JB, Pignatelli S, Biondi DM, Ruberto G, Musumecis S (2005) Nutrition rehabilitation of HIV-infected and HIV-negative undernourished children utilizing *spirulina*. *Ann Nutr Metab* 49(6):373–380
41. Simpre J, Kabore F, Zongo F, Dansou D, Bere A (2006) Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing *spirulina* and misola. *Nutr J* 23(5):3–9
42. Stevanato E, Gobatto CA, Mello MAR, Kokubun E (1998) Free fatty acid concentration did not affect carbohydrate metabolism in soleus muscle in vitro. *Med Sci Sport Exerc* 30:S247
43. Svanberg E, Svaninger G, Soussi B, Lundholm K (1999) Mouse extensor digitorum muscle preparation as a tool in nutrition research: a quantitative comparison to in vivo and cell culture experiments. *Nutrition* 15:200–207
44. Torun B, Chew F (1994) Protein energy malnutrition. *Mod Nutr Health Dis* 2:950–976
45. Tranquille N, Emeis JJ, Chambure D, Binot R, Tamponnet C (1994) *Spirulina* acceptability trials in rats. A study for the “Melissa” life-support system. *Adv Space Res* 14(11):167–170
46. Waalkes TP, Udenfriend S (1957) Tyrosine in plasma and tissues. *J Lab Clin Med* 50(5):733–736
47. Winick M, Basel JA, Rosso P (1972) A nutrition and cell growth. In: Winick M (ed) *Nutrition and development*. Wiley, New York, pp 49–97

10.3- Apresentação do artigo científico, derivado da presente Tese de Doutorado, publicado na Revista da Educação Física UEM (2007):

VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; GOBATTO, C.A. Determinação da transição metabólica através do teste do lactato mínimo em ratos desnutridos

DETERMINAÇÃO DA TRANSIÇÃO METABÓLICA ATRAVÉS DO TESTE DO LACTATO MÍNIMO EM RATOS DESNUTRIDOS DURANTE EXERCÍCIO DE NATAÇÃO¹

DETERMINATION OF METABOLIC TRANSITION BY LACTATE MINIMUM TEST IN MALNOURISHED RATS DURING SWIMMING EXERCISE

Fabrício Azevedo Voltarelli*
Claudio Alexandre Gobatto*
Maria Alice Rostom de Mello*

RESUMO

O presente estudo foi delineado para determinar a transição metabólica (TM) durante o teste do lactato mínimo de natação (TLM) em animais sedentários submetidos a desnutrição protéica. Ratos Wistar jovens foram separados em dois grupos: controle caseína 17% (C) (30 aos 150 dias de idade); e desnutrido caseína 6% (D) (30 aos 150 dias de idade). Foram avaliados: a) bioquímica sanguínea: concentrações de AGL, albumina e proteínas totais; b) fígado: concentrações de lipídios e c) peso e comprimento corporais. Para determinação da TM, utilizou-se o TLM adaptado às condições do rato. Foi utilizado teste *t* de *student* para amostras independentes para indicar diferenças estatísticas entre os grupos ($P < 0,05$). Os animais do grupo D mostraram hipoalbuminemia, hipoproteinemia e baixo peso corporal, que são sinais de desnutrição. Os ratos desnutridos apresentaram concentração de lactato sanguíneo equivalente a TM inferior à apresentada pelos animais-controle em uma mesma carga de exercício.

Palavras-chave: Teste do lactato mínimo. Ratos. Desnutrição protéica.

INTRODUÇÃO

A desnutrição protéica se caracteriza como um problema de saúde pública, afetando grande parte da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento (DÂMASO, 2001). No Brasil, mesmo em regiões com alta renda *per capita*, há uma incidência significativa de desnutrição: 6% (BRASIL, 1996). Em outras regiões as taxas de desnutrição são ainda maiores: 17% da população com menos de cinco anos de idade são desnutridos (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003).

O *kwashiorkor* é uma manifestação clínica da desnutrição protéica, caracterizada pelo decréscimo das taxas corporais totais de síntese e degradação protéicas e pela diminuição dos níveis de atividade física, sendo estes considerados uma adaptação à ingestão inadequada de proteína. Os sintomas iniciais

de deficiência protéica, incluindo perda de peso, atraso no crescimento, fadiga e insuficiência energética, são não-específicos, porque podem ocorrer após uma deficiência na quantidade ou na qualidade da proteína (DÂMASO, 2001). A desnutrição protéica representa alterações metabólicas e fisiológicas e resulta em populações adultas com baixa estatura, se comparadas às populações bem-nutridas (TORUN; CHEW, 1994). Estatura baixa é frequentemente relacionada a redução da capacidade de trabalho e de *performance* (TORUN; CHEW, 1994), no entanto, são raras na literatura as informações a respeito da capacidade bioquímica de organismos desnutridos para a realização do exercício físico.

Uma vez que existem limitações óbvias em estudos com seres humanos, modelos experimentais oferecem uma condição

¹ Apoio: Capes.

* Universidade Estadual Paulista – Unesp Campus Rio Claro.

alternativa para solucionarmos o problema. Recentemente, nosso grupo desenvolveu um protocolo para avaliação de ratos durante o exercício de natação (VOLTARELLI et al., 2002), baseado nos princípios fundamentais do teste do lactato mínimo (TLM), originalmente descrito para a avaliação de atletas (TEGTBUR et al., 1993).

O TLM original envolve a realização de exercício supramáximo por um curto período de tempo, com o objetivo de induzir a hiperlactacidemia antes do início do teste-padrão efetuado com cargas progressivas em esteira rolante. O lactato sanguíneo mínimo foi definido como a velocidade na qual a curva em forma de “U” obtida através dos valores de lactato sanguíneo, durante o teste progressivo, atinge o nadir. Esse valor de lactato sanguíneo mínimo supostamente indica a transição metabólica (TM) aeróbio/anaeróbio durante o exercício (TEGTBUR et al., 1993). Usando o protocolo adaptado para as condições do rato, nós fomos capazes de determinar, com sucesso, a transição metabólica de ratos eutróficos durante exercício de natação (VOLTARELLI et al., 2002).

Partindo do princípio de que a determinação do lactato sanguíneo mínimo requer apenas um teste, efetuado somente em um dia, tal teste pode ser adequado para ratos submetidos a desnutrição protéica durante o exercício de natação. Portanto, o presente estudo teve como objetivo determinar a transição metabólica aeróbio/anaeróbio pelo teste do lactato mínimo, adaptado às condições do rato durante a natação, em animais sedentários submetidos a desnutrição protéica. Animais sedentários não submetidos a desnutrição protéica (controles) foram também avaliados pelo teste do lactato mínimo, para fins de comparação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os experimentos envolvendo animais, no presente estudo, seguiram as resoluções específicas brasileiras de Bioética de Experimentos com Animais (Lei número 6.638 de 8 de maio de 1979; Decreto número 24.645 de 10 de Julho de 1934, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, jovens (30 dias de idade, no

início do experimento), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu/SP. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) e foram alimentados com dietas semipurificadas e água *ad libitum*, bem como mantidos sob ciclo periódico claro e escuro de 12 horas à temperatura média de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Dietas e grupos

Os ratos ($n=20$) foram divididos, randomicamente, em dois grupos grupo-controle e grupo desnutrido - e alimentados com dietas protéicas isocalóricas (3948 Kcal/kg) normoprotéica (caseína 17%) ou hipoprotéica (caseína 6%) *ad libitum* durante 16 semanas, respectivamente. A dieta normoprotéica conteve quantidades de carboidrato (39,7% de amido de milho; 13,2% de dextrina e 10% de sacarose), gordura (7,0% de óleo de soja), fibra (5,0% de fibra microcelulose), mistura de sais minerais (3,5%) e mistura de vitaminas (1,0%), de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition (AIN-G93) (REEVES et al., 1993). A dieta hipoprotéica conteve mais carboidrato (44,4% de amido de milho; 17,8% de dextrina e 14,9% de sacarose), mas a mesma quantidade de gordura, fibra e misturas de sais minerais e vitaminas, se comparada à dieta-controle.

Durante todos os procedimentos experimentais, os animais foram pesados e medidos (comprimento focinho-ânus) semanalmente. A ingestão alimentar foi acessada diariamente.

Ao final de 8 semanas, os ratos de ambos os grupos foram submetidos ao TLM de natação para a determinação da TM (% do peso corporal e concentração de lactato sanguíneo / mmol/L).

Adaptação ao meio líquido

A adaptação consistiu em manter os animais em contato com água rasa à temperatura de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante três semanas, cinco dias por semana, por 45 minutos. Na 2ª e 3ª semanas de adaptação, os ratos suportaram sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal. O propósito da adaptação foi reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água.

Teste do lactato mínimo (TLM) adaptado às condições do rato

Inicialmente, os animais foram colocados em tanques cilíndricos individuais (50cm de profundidade e 25cm de diâmetro) cheios de água, e suportaram sobrecarga equivalente a 15% do peso corporal, realizando exercício de alta intensidade durante 6 minutos (30 segundos de exercício interrompidos por 30 segundos de repouso) para a elevação da concentração de lactato sanguíneo. Após 9 minutos de repouso, os animais iniciaram exercício de natação com intensidades progressivamente maiores (3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,5% do peso corporal), 5 minutos em cada carga (VOLTARELLI et al., 2002). Antes do início do teste (repouso) e a cada troca de carga, amostras de sangue foram coletadas (25µL) para a determinação da concentração de lactato. Os valores mínimos de lactato sanguíneo (mmol/L) e de carga de exercício (% do peso corporal) foram obtidos através do Microsoft Excel (função polinomial de 2º grau) e, por sua vez, indicaram a transição metabólica aeróbio/anaeróbio.

Sacrifício dos animais

Ao final do experimento, os ratos foram sacrificados por decapitação para a coleta de material biológico: a) amostras de sangue, para determinação das concentrações de proteínas totais, albumina e ácidos graxos livres (AGL) e b) alíquotas do fígado, para determinação das concentrações de lipídio.

Avaliações bioquímicas

As concentrações séricas de proteínas totais, albumina e AGL e as concentrações de lipídio no fígado foram determinadas pelos métodos colorimétricos, de acordo com Nogueira et al. (1990). A concentração de lactato sanguíneo foi determinada pelo método enzimático, proposto por Engels e Jones (1978).

Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio-padrão. Foi utilizado teste t de *student* para amostras independentes para indicar diferenças significativas entre os grupos. O nível de significância foi preestabelecido em 5%.

RESULTADOS

Efeitos da dieta hipoprotéica sobre o estado nutricional

Pode-se observar, a partir da Tabela 1, que após 16 semanas os ratos desnutridos mostraram ganho de peso corporal e incremento no comprimento corporal (comprimento focinho - ânus) reduzidos, baixas concentrações de proteína sérica, albumina e AGL e elevada concentração de lipídio no fígado quando comparados ao grupo-controle. A respeito do baixo ganho de peso corporal observado nos animais desnutridos, não foram encontradas diferenças significativas na ingestão alimentar por grama de peso corporal, observada durante o período experimental, entre os dois grupos.

Tabela 1 - Ganho de peso corporal (n=10; g), incremento no comprimento corporal (ICC) (n=10; cm) e ingestão alimentar (g/100g de peso corporal/dia) e concentrações de lipídios no fígado (n=8; mg/100mg), albumina (n=8; g/dL), AGL (n=8; µEq/L) e proteína (n=8; g/dL) séricas utilizados para avaliação do estado nutricional dos animais.

Parâmetros	Caseína 17%	Caseína 6%
Ganho de peso corporal	435,7 \pm 31,4	222,9 \pm 53,3*
ICC	11,8 \pm 0,8	7,3 \pm 0,9*
Ingestão alimentar	12,6 \pm 0,9	12,5 \pm 0,8
Lipídios no fígado	4,4 \pm 0,5	12,0 \pm 1,2*
Albumina sérica	7,4 \pm 0,4	3,8 \pm 0,4*
AGL sérico	382,5 \pm 31,0	170,0 \pm 23,9*
Proteína sérica	7,5 \pm 0,2	4,5 \pm 0,3*

* Diferença significativa em relação ao grupo Caseína 17% (p < 0,05; teste t de student para amostras independentes).

Efeitos da dieta hipoprotéica sobre a concentração de lactato sanguíneo durante o TLM

A concentração de lactato sanguíneo de apenas um rato de cada grupo e sua respectiva carga de trabalho durante o teste do lactato mínimo estão apresentadas nas figuras 1 e 2. A curva referente aos valores de lactato sanguíneo derivada do teste de natação com cargas incrementais apresentou, como esperado, a forma de “U”. A TM calculada para o rato-controle (Figura 1) foi obtida na carga de 4,8% do peso

corporal na concentração de 6,3 mmol/L de lactato sanguíneo. Em relação ao animal desnutrido (Figura 2), a TM foi calculada na carga de 4,9% do peso corporal a 4,2mmol/L de concentração de lactato sanguíneo. Os valores médios calculados de TM, expressos como a carga em que o lactato sanguíneo mínimo apareceu, para todos os animais de ambos os grupos, foi de $4,9 \pm 0,3\%$ do peso corporal a $6,2 \pm 0,1$ mmol/L de lactato sanguíneo no grupo controle (n=10), enquanto o grupo desnutrido (n=10) teve a TM obtida na carga de $4,9 \pm 0,2\%$ do peso corporal a $4,2 \pm 0,4$ mmol/L de lactato sanguíneo.

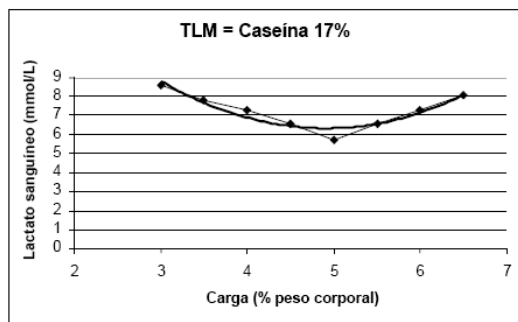


Figura 1 - Curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste do lactato mínimo de um rato no estado normal. A curva foi obtida por ajuste polinomial de 2º grau, com auxílio de programa de computador (EXCEL®). A equação a seguir, que definiu a curva, possibilitou o cálculo do menor valor da concentração de lactato sanguíneo (LS) e respectivas cargas de trabalho (peso corporal – pc): $y = 0,1714x^2 - 1,65x + 10,304$ (4,8% do pc à 6,3 mmol/L de LS). Esse menor valor de lactato sanguíneo indicou a carga de trabalho equivalente à TM.

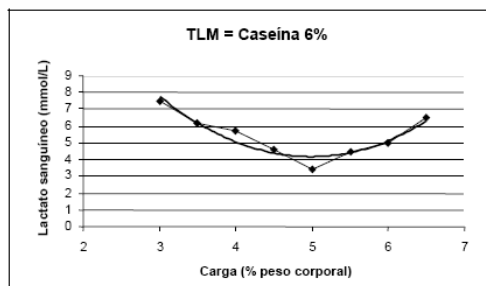


Figura 2 - Curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste do lactato mínimo

de um rato no estado desnutrido. A curva foi obtida por ajuste polinomial de 2º grau, com auxílio de programa de computador (EXCEL®). A equação a seguir, que definiu a curva, possibilitou o cálculo do menor valor da concentração de lactato sanguíneo (LS) e respectivas cargas de trabalho (peso corporal – pc): $y = 0,2298x^2 - 2,2798x + 9,825$ (4,9% do pc à 4,2 mmol/L de LS). Esse menor valor de lactato sanguíneo indicou a carga de trabalho equivalente à TM.

DISCUSSÃO

A deficiência protéica ainda é prevalente e pode aumentar a incidência e conseqüente instalação do *kwashiorkor* (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003). Por essa razão, no presente estudo, nós avaliamos a transição metabólica durante exercício de natação em um modelo animal de desnutrição bem caracterizado (LATORRACA et al., 1998; LATORRACA et al., 1999; MELLO et al., 2003; ALMEIDA; MELLO, 2004). Baixos ganhos de peso e comprimento corporais, hipoalbuminemia, hipoproteinemia e elevado conteúdo de lipídio no fígado, como observado em nossos animais (Tabela 1) mantidos com a dieta hipoprotéica, são sinais comumente encontrados (quadro semelhante) no *kwashiorkor* infantil (TORUN; CHEW, 1994) e em animais desnutridos experimentalmente (ALMEIDA; MELLO, 2004). Esses resultados indicam a adequação do modelo animal de desnutrição protéica utilizado no presente estudo. Como não houve diferença significativa na ingestão alimentar por grama de peso corporal entre os ratos alimentados com as dietas normoprotéica e hipoprotéica, o modelo, então, representa deficiência protéica e não-deficiência protéico-energética.

A concentração sérica de AGL apresentada pelos ratos desnutridos do presente estudo foi significativamente menor em relação aos animais alimentados com a dieta normoprotéica (Tabela 1), confirmando resultados prévios da literatura (ALMEIDA; MELLO, 2004). Estudos usando modelo experimental mostraram que a 6-desaturase, uma enzima-chave na síntese dos ácidos graxos essenciais, aparece inibida na

situação de jejum e nas deficiências de insulina, proteína e zinco, condições frequentemente observadas em crianças desnutridas (GOLDEN, M.; GOLDEN, B., 1981).

Em relação ao conteúdo de lipídio no fígado, houve um aumento significativo nos ratos desnutridos quando comparados ao grupo-controle. Tal achado confirma estudos prévios (MELLO, 1985; ALMEIDA; MELLO, 2004) e ocorre como consequência do transporte deficiente de lipídios para fora do fígado em organismos acometidos pela deficiência protéica (COWARD; WHITEHEAD, 1972).

Por razões óbvias, tem sido conduzido um número significativo de estudos envolvendo exercício e nutrição em animais de laboratório, principalmente em ratos, e a concentração de lactato sangüíneo, visando à determinação de intensidades de esforço.

Hoje, as mensurações referentes à TM (isto é, limiares) são muito utilizadas no sentido de avaliar o nível de *performance* de atletas, assumindo que quanto mais alto o limiar, mais alta a capacidade aeróbia do indivíduo. Determinações da TM têm provado ser também de grande valor em estudos clínicos utilizando modelos animais, tais como os de diabetes *mellitus*, da obesidade e da desnutrição (MELLO; LUCIANO, 2000).

Em um estudo prévio, a TM de ratos normais e sedentários foi obtida pelo nosso grupo de pesquisa (VOLTARELLI et al., 2002), durante o TLM, na carga média calculada de $4,9 \pm 0,1\%$ do peso corporal dos animais a $7,2 \pm 0,2$ mmol/L de concentração média de lactato sangüíneo. A carga de exercício e a concentração de lactato sangüíneo calculados, equivalentes à TM, observados no rato alimentado com a dieta normoprotéica do presente estudo (Figura 1), foram similares aos valores obtidos anteriormente por nós (VOLTARELLI et al., 2002). Em relação ao rato desnutrido, pôde-se observar que a carga de trabalho equivalente à TM obtida através do TLM foi similar (figura 2) à do controle (figura 1) e àquela observada em nosso estudo prévio (VOLTARELLI et al., 2002). Por outro lado, a concentração de lactato sangüíneo correspondente à TM foi menor no animal alimentado com a dieta hipoprotéica (Figura 2), se comparado ao animal-controle (figura 1). A

mesma diferença entre o animal-controle e o desnutrido ocorre quando os valores médios de ambos os grupos são considerados.

Alteração similar na cinética de lactato sangüíneo em ratos desnutridos (deficiência protéica) foi reportada em estudo recente (PAPOTI et al., 2003). Esse estudo utilizou a máxima fase estável de lactato (MFEL) como meio de determinação da transição metabólica aeróbio/anaeróbio em ratos durante exercício de natação. A MFEL foi obtida, em ratos normais e em ratos alimentados com a dieta hipoprotéica, na mesma intensidade de esforço (5,5% do peso corporal); no entanto, houve diferença significativa na concentração de lactato sangüíneo equivalente à intensidade da MFEL (ratos controle: 5,5 mmol/L de lactato sangüíneo; ratos acometidos pela desnutrição protéica: 4,7 mmol/L de lactato sangüíneo).

Os valores mais baixos de lactato sangüíneo observados nos animais alimentados com a dieta hipoprotéica em relação aos animais-controle (alimentados com a dieta normoprotéica) para uma mesma carga de exercício podem ser atribuídos, pelo menos em parte, às alterações em atividades enzimáticas. Existem dados na literatura indicando redução da atividade de várias enzimas teciduais em organismos submetidos a restrição protéica (PENNEY et al., 1976; NGUYEN; KEAST, 1991; TORUN; CHEW, 1994; SANTOS et al., 1997). Com isso, uma alteração enzimática causada pela desnutrição protéica poderia acarretar inibição da via glicolítica, modificando assim a concentração de lactato sangüíneo durante o exercício.

Santos et al. (1997) determinaram a atividade das enzimas glicolíticas (hexoquinase, fosfofrutoquinase, aldolase, fosfoexoseisomerase, piruvato quinase e lactato desidrogenase) e de uma enzima glutaminolítica (glutaminase fosfato-dependente) no timo e em nodos linfáticos mesentéricos de ratos *wistar* submetidos a desnutrição protéica (6% de proteína da dieta), da concepção até 12 semanas após o nascimento. A atividade da glutaminase não foi afetada pela desnutrição protéica, mas a atividade das enzimas glicolíticas do timo e dos nodos linfáticos foi reduzida pela metade nos ratos desnutridos, quando comparados aos animais-controle. Em um estudo empírico prévio, Penney et al. (1976) observaram que a atividade da enzima lactato desidrogenase,

determinada tanto por eletroforese como por espectrofotometria, foi obtida em valores significativamente menores na musculatura esquelética de ratos desnutridos. Após cinco semanas de recuperação nutricional, os animais previamente desnutridos mostraram um grande aumento na atividade desta enzima glicolítica. Além disso, as atividades máximas da hexoquinase, 6-fosfofrutoquinase, lactato desidrogenase, citrato sintase e glutaminase, as quais proporcionam índices quantitativos de fluxo em várias vias importantes, foram mensuradas nas peles de camundongos Balb/c (presença congênita de pelo sob a pele) e Balb/c [nu/nu] (ausência congênita de pelo sob a pele) submetidos a dietas normais e de estresse do ponto de vista nutricional e metabólico (NGUYEN; KEAST, 1991). Esses autores observaram que a atividade de todas as enzimas associadas com o metabolismo energético, na pele dos animais de ambos os grupos, foi suprimida quando estes foram alimentados com uma dieta deficiente em componentes protéicos. Não obstante, para a confirmação dessa hipótese, seria necessário mensurar, principalmente, a atividade da enzima LDH nesses animais.

CONCLUSÃO

- Foi possível determinar a transição metabólica aeróbio/anaeróbio em ratos

desnutridos através do teste do lactato mínimo durante exercício de natação.

- Os animais desnutridos apresentaram concentração de lactato sanguíneo equivalente à transição metabólica obtida durante o teste do lactato mínimo e mais baixa em relação aos animais-controle para uma mesma carga de exercício, indicando que a restrição protéica altera a cinética de lactato sanguíneo durante a natação em ratos.
- Mais estudos são necessários para identificar, com maior riqueza de informações: a) as causas reais da diminuição da concentração de lactato sanguíneo, durante a realização do exercício físico, verificada nos animais submetidos a desnutrição protéica e b) por que a ausência de diferenças significantes entre ratos alimentados com dietas pobres em proteína e ratos-controle, no que diz respeito à carga de ocorrência da TM determinada pelo teste do lactato mínimo, comumente ocorre em estudos dessa natureza.

DETERMINATION OF METABOLIC TRANSITION BY LACTATE MINIMUM TEST IN MALNOURISHED RATS DURING SWIMMING EXERCISE

ABSTRACT

This study's aim was to determine the metabolic transition (MT) by the lactate minimum test (LMT) in sedentary malnourished rats. Young male Wistar rats were separated into two groups, for 16 weeks: Casein 17% (Control; from 30 to 150 days of age); Casein 6% (Malnourished; from 30 to 150 days of age). It was evaluated: a) blood FFA, albumin and total protein concentrations; b) liver lipids concentrations and c) body weight and body length. For determination of MT was the LMT was used. The data were analyzed by Student's unpaired t-test ($P < 0.05$). The malnourished rats showed hypoalbuminemia, hypoproteinemia and low body weight, which are malnutrition signs. The malnourished rats had blood lactate concentration at MT lower in relation to control animals but same exercise workload.

Key words: Lactate minimum test. Rats. Protein malnutrition.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. B. L.; MELLO, M. A. R. Desnutrição protéica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. *Revista Brasileira de Educação Física*, Brasília, DF, v. 18, n. 1, p. 17-30, 2004.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Caderno de*

Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.19, n.1, p. 5181-5191, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pesquisa nacional sobre demografia e saúde 1996: relatório preliminar**. Brasília, DF, 1996.

COWARD, W. A.; WHITEHEAD, R.G. Changes in serum b-lipoprotein concentration during the development of kwashiorkor and in recovery. *British Journal of Nutrition*, Wallingford, v. 27, p. 383-389, 1972

- DÂMASO, A. **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- ENGELS, R.C.; JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blanc in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 88, p. 475-484, 1978.
- GOLDEN, M.H. N.; GOLDEN, B. E. Effect of zinc supplementation on the dietary intake, rate of weight gain, and energy cost of tissue deposition in children recovering from severe malnutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 34, p. 900-908, 1981.
- LATORRACA, M. Q. et al. Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with diminished calcium uptake. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.10, p. 37-43, 1999.
- LATORRACA, M.Q. et al. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and early steps on insulin action in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, p. 1643-1649, 1998.
- MELLO, M. A. R. **Desnutrição protéico-calórica, gravidez e desenvolvimento materno: estudo comparativo de alterações corporais e metabólicas em ratos jovens e adultas**. 1985. Tese (Doutorado)–Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.
- MELLO, M. A. R. et al. Glucose homeostasis in pregnant rats submitted to protein restriction. **Research communications in molecular pathology and pharmacology**, Westbury, v.113/114, p. 229-248, 2003.
- MELLO, M.A.R.; LUCIANO, E. Efeitos bioquímicos da ingestão de carboidrato líquido durante o exercício aeróbio em ratos recuperados de desnutrição. **Revista Paranaense de Educação Física**, Curitiba, v.1, n. 2, p. 7-14, 2000.
- NGUYEN, T. D.; KEAST, D. The effects of diet on the maximal activities of glutaminase, citrate synthase, hexokinase, 6-phosphofructokinase and lactate dehydrogenase in the skin of haired and hairless mice of various age. **International journal of biochemistry**, Oxford, v. 23, no. 3, p. 365-369, 1991.
- NOGUEIRA, D. M. et al. **Métodos de bioquímica clínica**. São Paulo: Pancas Editorial, 1990.
- PAPOTI, M. et al. Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição protéica. **Motriz**: Revista de Educação Física, Rio Claro, v. 9, n. 2, p. 97-103, 2003.
- PENNEY, D.; ANDERSON, D.; DONGAS, J. Effects of early severe malnutrition on heart and skeletal muscle lactate dehydrogenase. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 106, no. 9, p. 1235-1240, 1976.
- REEVES, P. G. et al. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition AdHoc Writing Committee on the Reformulation of AIN-76A. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, p. 1938-1951, 1993.
- SANTOS, M. A et al. Effect of protein malnutrition on the glycolytic and glutaminolytic enzyme activity of rat thymus and mesenteric lymph nodes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 719-722, 1997.
- TEGTBUR, U. et al. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, Hagerstown, v. 25, no. 5, p. 620-627, 1993.
- 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, 1994. p. 950-976.
- VOLTARELLI, F. A. et al. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 35, p. 1389-1394. 2002.

Recebido em 23/03/07
 Revisado em 25/05/07
 Aceito em 05/06/07

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o indispensável apoio dos técnicos do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da Unesp Campus Rio Claro: Clarice Sibuya, Eduardo Custódio e José Roberto Rodrigues.

Endereço para correspondência: Fabrício Azevedo Voltarelli. Universidade Estadual Paulista–Unesp, Campus Rio Claro, Departamento de Educação Física, Av. 24-A, 1515, Bairro: Bela Vista, CEP 13506-900, Rio Claro-SP, Brasil. E-mail: faunesp8@yahoo.com.br

10.4- Apresentação do artigo científico em Inglês, derivado da presente Tese de Doutorado, submetido ao Journal of Ethnopharmacology (Fator de Impacto: 2,049) (2008):

VOLTARELLI, F.A; ARAÚJO, M.B; RIBEIRO, C; MOTA, C.S.A; MELLO, M.A.R.
Spirulina as the dietary protein source for rats recovering from malnutrition: effects on muscle protein and body growth.

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Spirulina* is a helicoidal shaped blue green alga whose special merits as food are that it contains 65 to 70 percent protein on dry weight basis and has all eight essential amino acids to men, besides being low cost: **Aim of the Study:** The present study aimed to evaluate the effects of *Spirulina maxima* as the sole dietary source of protein on muscle protein and body growth of rats recovering from protein malnutrition. **Materials and Methods:** Young (30 days) Wistar rats were separated into 5 groups: I- Casein 17% (C17; 30-150 days of age (d/a)); II- *Spirulina* 17% (S17; 30-150 d/a); III- Casein 6% (C6; 30-150 d/a); IV- Casein 6% (30-90 d/a) and *Spirulina* 17% (91-150 d/a) (C6/S17) and V- Casein 6% (30-90 d/a) and Casein 17% (91-150 d/a) (C6/C17). Muscle total protein and DNA contents as well as the protein synthesis and degradation rates were investigated to infer on muscle growth and on muscle protein, respectively. **Results:** The protein malnourished group (C6) presented lower total protein and DNA contents in the soleus muscle if compared to other groups. The nutritional recovery, using both diets, re-established these parameters. *Spirulina* and casein diets reduced the protein degradation and increased the protein synthesis in the soleus muscle of the previously malnourished rats. **Conclusions:** *Spirulina* proved to be an adequate protein source to recovery body weight gain and muscle protein of protein malnourished rats.

Key words: Muscle protein; *Spirulina plantesis*; Rats; Malnutrition.

1- Introduction

As we enter the 21st century, malnutrition remains an important factor impairing health and production of large human populations. In Brazil, 30.7% of the children under five years suffer from some type of malnutrition; in the south east region, the more affluent of the country, the prevalence of malnutrition is around 21.7% (Ministério da Saúde, 1996).

There are a great number of forms of malnutrition; marasmus and kwashiorkor are clinical manifestations of severe protein-calorie malnutrition. Protein malnutrition has deleterious effects in a great number of organ systems, leading to accentuate metabolic disturbances, which may alter food processing when feeding resumes. Thus, the widely prevalent marginal protein-malnutrition may result in severe growth impairment and physiological alterations (Galdino et al, 2001).

To this day, with the continuing low level of available protein food all over the world and increasingly urgent need for low-cost food of good nutritional value, the exploration of biomasses as alternative protein sources became a matter of general interest. The use of algae (seaweed) in human alimentation is ancient. In the East, in particular, such source of food material have been tried extensively, in the hope of correcting the widespread protein deficiency that characterizes the nutritional status of less favored populations (Kay, 1991; Simapore et al, 2006).

Spirulina is a helicoidal shaped blue green alga with length of 0.2-0.3 mm (Hadenstog and Hofsten, 1979; Costa et al, 2006). *Spirulina*'s special merit as a food source is that it contains 65 to 70 percent protein on dry weight basis, which is higher than any other natural food and has all eight essential amino acids to men (Li et al, 2006). It normally grows in naturally alkaline lakes located in arid zones. Although the alkaline water from such lakes cannot be used for irrigation, it can be used for cultivation of *Spirulina* (Kay, 1991; Simapore et al, 2006). Since this alga has a rapid reproduction rate, dividing three times a day, a pond devoted totally to the growth of *Spirulina* can produce 125 times as much protein as the same amount area devoted to corn, 70 times as much protein as to fish and 600 times as much as cattle (Furst, 1978; Branger et al, 2003).

According to previous evaluations, *Spirulina* seems to be a good alimentary protein source for human subjects. It has adequate acceptance and does not appear to exert any toxic effects, although it has slightly reduced digestibility (Sautier and

Tremolieres, 1975; Simpure et al, 2005). The most detailed studies on the nutritional value of *Spirulina* have been conducted in rodents, mostly rats. The rodent studies covered a variety of parameters, such as body growth (Tranquille et al, 1994; Salazar et al, 1996), protein efficiency ratio (PER) and net protein utilization (NPU) (Narayan et al, 2005), sexual maturation (Contreras et al, 1979), reproductive performance (Salazar et al, 1996), hematological status (Kapoor and Metha, 1998), toxicity (Chen and Pan, 2005), among others. *Spirulina* proved adequate to maintain all these physiological makers at normal levels and did not produce adverse effects after chronic treatment.

To the author's knowledge, there is little information about the effects of *Spirulina* on tissues with high metabolic rates, such as skeletal muscle, during recovery from protein malnutrition. Skeletal muscle is susceptible to protein malnutrition because it is one of the body's most important protein stores (Alves et al, 2008). Therefore, when there is a dietary protein deficiency, this tissue becomes target of depletion (Nascimento et al, 1990; Ihemelandu, 1995; Oliveira et al, 1999). Thus, the present study was designed to evaluate the effects of *Spirulina* as the sole dietary protein source in rats recovering from malnutrition on body growth as well as on skeletal muscle protein.

2- Materials and Methods

2.1- Animals

All experiments involving animals followed both the specific Brazilian resolutions of the Bioethics of Experiments with Animals (law No 6.638 of May 8th 1979; Decree No. 24.645 of July 10th 1934, Brazilian College of Animal Experimentation) and the internationally accepted principles for laboratory animal use and care in the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC). Young (30 days old at the start of the experiment) male Wistar rats, weighing 119.5 ± 12.7 g and measuring (nose-to-anus length) 19.1 ± 1.2 cm, obtained from the animal facilities of the UNESP – Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil, were used.

2.2- Diets

Semi-purified diets, containing 17% of protein represented by casein (powdered protein free diet plus casein - powdered milk protein), 6% of protein represented by casein, and 17% of protein represented by *Spirulina* (powdered protein free diet plus *Spirulina* - powdered *Spirulina maxima* sold commercially by All Chemistry do Brasil Ltda.), as described in Table 1, were employed.

Table 1. Diets composition (g/kg)

Components	Casein 17%*	<i>Spirulina</i> 17%	Casein 6%**
Spirulina (65% protein)***	-	280.0	-
Casein (84% protein)****	202.2	-	71.5
Cornstarch Dextrinized	397.0	386.0	480.0
cornstarch	130.5	130.5	159.0
Sucrose	100.0	100.0	121.0
Soybean oil	70.0	70.0	70.0
Fiber (microcellulose)	50.0	50.0	50.0
Mineral mix	35.0	35.0	35.0
Vitamin mix	10.0	10.0	10.0
L-cystine	3.0	3.0	3.0
Choline Hydrochloride	2.5	2.5	2.5

* Diet for growth phase, pregnancy and lactation of rodents – AIN – 93G (Reeves et al, 1993)

** Diet for malnutrition induction (Latorraca et al., 1998)

*** Corrected values due to protein content in *Spirulina* (Albanese and Orto, 1963)

**** Corrected values due to protein content in casein (Albanese and Orto, 1963)

The *Spirulina* powder composition was as follows. General analysis (%): protein 64.7, carbohydrates 15, lipids 6, minerals (ash) 7, fiber 8. Minerals (mg/10g): calcium 70, iron 15, phosphorus 80, magnesium 40, zinc 0.3, manganese 0.5, sodium 90, potassium 140; minerals (mcg/10g): selenium 10, copper 120, chromium 25. Vitamins (per 10g): vitamin A 23000IU, beta carotene 14 mg, vitamin D 1200IU, vitamin E 1.0 mg, vitamin K 200 mcg, biotin 0.5 mcg, inositol 6.4 mg, thiamine 0.35 mg, riboflavin 0.4 mg, niacin 1.4 mg, pyridoxine 80 mcg, folate 1mcg, cianocobalamine 20 mcg, pantothenic acid 10 mcg. Essential amino acids (mg/10g): isoleucine 350, leucine 540, lysine 290, methionine 140, phenylalanine, 280, threonine 320, tryptophan 90, valine

400. Non essential amino acids (mg/10g): alanine 470, arginine 430, aspartic acid 610, cystine 60, glutamic acid 910, glycine 320, histidine 100, praline 270, serine 320, tyrosine 300. Total amino acids (g/10g): 6.2.

2.3- Design and Experimental Groups

Young (30 days at the start of the experiment) male Wistar rats were separated into 5 groups (n=8/group), according to diet received during the experiment:

I- Casein 17% (C17) from 30 to 150 days of age;

II- *Spirulina* 17% (S17) from 30 to 150 d/a;

III- Casein 6% (C6) from 30 to 150 d/a;

IV- Casein 6% from 30 to 90 days and *Spirulina* 17% from 91 to 150 d/a (C6/S17) ;

V- Casein 6% from 30 to 90 days and Casein 17% from 91 to 150 d/a (C6/C17).

During the experiment, the rats had free access to food and water and were housed on a 12 h light/dark cycle at room temperature of 25°C. Food intake was monitored daily and body weight and length were measured (nose-to-anus length) once a week. In addition, the food efficiency (body weight gain [g] / ingestion [g]) and protein efficiency (body weight gain [g] / protein ingestion [g]) ratios were calculated.

2.4- Tissue Extraction

At the end of the experimental period, all animals were killed by decapitation. Blood samples were collected for serum glucose, total protein, albumin and free fatty acid (FFA) measurements (Nogueira et al, 1990). Samples of the liver were taken for total lipids (Nogueira et al, 1990) and glycogen (Siu Lo and Taylor, 1970) determinations. Left soleus muscle was excised, weighed and analyzed for total protein (Lowry et al, 1951) and DNA (Giles and Meyers, 1961) contents as well as protein/DNA ratio, to infer on growing of skeletal muscle. Longitudinal strips (70 mg) from the right soleus muscle were obtained for protein synthesis and degradation assays. Gastrocnemius muscle strips (100-200mg) were collected to alkaline phosphatase enzyme activity determination.

2.5- Protein synthesis

The soleus muscle strips were preincubated for 30 min in RPMI 1640 medium (with glutamine and without red phenol and sodium bicarbonate), supplemented with bovine serum albumin fatty acid free (BSA) [1g/l] and insulin [100 U/ml], saturated with 95% O₂/5% CO₂ gas mixture. They were then transferred into a fresh RPMI 1640 medium with the same supplementation containing 14-C phenylalanine [0.05 µCi/ml] and incubated for 2 hours. At the end of the incubation, the muscle strips were homogenized in 5% trichloroacetic (TCA) and centrifuged at 2000 rpm for 15 min at 4° C. TCA-insoluble material was washed 3 times with 5% TCA. The resultant pellet was solubilized in 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) at room temperature for 30 min for determination of protein content and radioactivity incorporated to muscle proteins. Muscle protein was determined by the folinphenol method (Lowry et al, 1951) and the protein bound radioactivity was measured using scintillation counting. Protein synthesis was calculated by dividing the protein-bound radioactivity by the specific activity of the free phenylalanine in the incubation medium and expressed as nanomoles of phenylalanine incorporated per milligram of protein per 2 hours.

2.6- Protein degradation

Tyrosine release from isolated muscle in presence of cyclohexamide was used as indicator of protein degradation as previously described by Fulks et al. (1975). This method makes use of the fact that the amino acid tyrosine is neither synthesized nor degraded by skeletal muscle. The soleus muscle strips were pre-incubated for 30 min in Krebs Ringer buffer [NaCl 1.2 mmol/L; KCl 4.8 mmol/L; NaHCO₃ 25 mmol/L; CaCl₂ 2.5 mmol/L; KH₂PO₄ 1.2 mmol/L and mgSO₄ 1.2 mmol/L; ph 7.4], supplemented with glucose [5.5 mmol/L], BSA [1.0 g/l], insulin [5 U/ml] and cyclohexamide [5 mmol/L], saturated with 95% O₂/5% CO₂ gas mixture. They were then transferred into fresh medium of the same composition and incubated for 2 hours. At the end of the incubation, samples of the incubation medium were used for the assay of tyrosine by the procedure of Waalkes and Udenfriend (1957).

2.7- Muscle Alkaline Phosphatase

The physiological role of alkaline phosphatase enzyme (APE) can be associated to transport systems and to cellular activity (Calhau et al, 1999). For this reason, this enzyme was measured in the muscle tissue of the animals. Gastrocnemius muscle strips (100-200mg) were excised and homogenised by sonication during 40 seconds in 500µl of distilled water. The homogenised was centrifuged to 2000rpm for 5 minutes and the supernatant was separated to measure the alkaline phosphatase by colorimetric method (Labtest® kit)

2.8- Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SD for the number of rats (n) indicated. In the protein synthesis and degradation assays as well as in the APE assay, n indicated the muscle strips number. The data were analyzed by ANOVA two-way test, followed by Bonferroni *post-hoc* test, and p values < 0.05 were considered to indicate significant difference.

3- Results

Body weight and length gains and serum protein, albumin and FFA concentrations were lower in the protein malnourished group (C6) when compared to the C17 and S17 normal protein groups and to the recovered groups (C6/C17 and C6/S17). On the other hand, liver total lipid concentrations appeared higher whereas liver glycogen concentrations appeared lower in the protein malnourished group (C6) in comparison to the other groups. No differences were observed in relation to food intake and protein efficiency ratio when all groups were compared whereas the food efficiency ratio was lower in the protein malnourished group (C6) if compared to the other groups (Table 2).

Table 2. Body weight (g) and length (cm) gains; food intake (g / 100 g of body weight); food efficiency ratio (body weight gain [g] / ingestion [g]) and protein efficiency ratio (body weight gain [g] / protein ingestion [g]); serum protein (g/dL), albumin (g/dL) and FFA ($\mu\text{Eq/L}$) concentrations and liver total lipids (mg/100mg) and glycogen (mg/100mg) contents of the animals at the end of the experiment.

Parameters	Groups				
	C17	S17	C6	C6/C17	C6/S17
Body weight gain	438.4± 22.1	436.9± 39.1	233.1±* 31.9	434.9± 32.8	435.3± 25.3
Body length gain	11.7± 0.4	11.9± 0.4	7.2±* 0.4	11.3± 0.3	11.2± 0.2
Food intake	12.6± 0.9	12.0± 0.5	12.5± 0.8	11.1± 0.7	11.6± 0.5
Food Efficiency Ratio	5.3± 0.3	5.1± 0.5	2.2±* 0.3	5.2± 0.4	5.0± 0.3
Protein Efficiency Ratio	3.4± 0.4	3.4± 0.5	3.3± 0.3	3.2± 0.4	3.3± 0.2
Serum Protein	7.5± 0.2	7.4± 0.3	4.5±* 0.3	7.3± 0.2	7.5± 0.4
Serum Albumin	7.4± 0.4	7.5± 0.5	3.8±* 0.4	7.6± 0.5	7.8± 0.3
Serum FFA	382.5± 12.1	379.9± 8.3	170.0±* 19.2	386.4± 10.0	381.0± 7.4
Liver total lipids	4.4± 0.5	4.5± 0.5	12.0±* 1.2	4.6± 0.4	4.3± 0.3
Liver glycogen	7.2± 0.2	7.3± 0.3	5.7±* 0.5	7.2± 0.4	7.0± 0.3

Results expressed as mean \pm SD from 8 rats per group

C17= Casein diet 16 weeks 17%; S17= *Spirulina* diet 16 weeks 17%; C6=Casein diet 16 weeks 6%; C6/C17=Casein diet 8 weeks 6% and Casein diet 8 weeks 17%; C6/S17=Casein diet 8 weeks 6% and *Spirulina* diet 8 weeks 17%

* Significantly different ($p < 0.05$, ANOVA two-way test) from the other groups.

The total protein and DNA contents as well as the protein/DNA ratio in the soleus muscle were decreased in the animals previously submitted to protein restriction (C6). These effects were counteracted by feeding both the casein and the *Spirulina* balanced diets for 8 weeks, since the results observed for the recovered groups (C6/C17 and C6/S17) were similar to those from the normal protein groups (C17 and S17) (Table 3). Protein synthesis decreased significantly whereas protein degradation

increased significantly in the protein deficient group (C6) when compared to the other groups (Figure 1 A and B). After 8 weeks of balanced casein diet or *Spirulina* diet treatment, the rates of protein synthesis (Figure 1A) were re-established in the recovered groups (C6/C17 and C6/S17) if compared to C17 and S17 normal protein groups. The same was observed in relation to protein degradation (Figure 1B).

The alkaline phosphatase enzyme activity in gastrocnemius muscle of the protein deficient animals (C6) was higher if compared to the other groups (Figure 2).

Table 3. Protein (g/100g), DNA (g/100g) contents and protein to DNA ratio in the soleus muscle of the animals at the end of the experiment.

Parameters	Groups				
	C17	S17	C6	C6/C17	C6/S17
Protein	3.5± 0.3	3.5± 0.4	1.4±* 0.2	3.2± 0.2	3.1± 0.3
DNA	0.148± 0.012	0.147± 0.009	0.139±* 0.014	0.145± 0.013	0.149± 0.014
Protein/DNA	23.9± 3.2	24.0± 3.5	10.2±* 2.4	21.9± 2.3	22.4± 3.1

Results expressed as mean ± SD from 8 rats per group

C17= Casein diet 16 weeks 17%; S17= *Spirulina* diet 16 weeks 17%; C6=Casein diet 16 weeks 6%; C6/C17=Casein diet 8 weeks 6% and Casein diet 8 weeks 17%; C6/S17=Casein diet 8 weeks 6% and *Spirulina* diet 8 weeks 17%

* Significantly different (p<0.05, ANOVA two-way test) from the other groups.

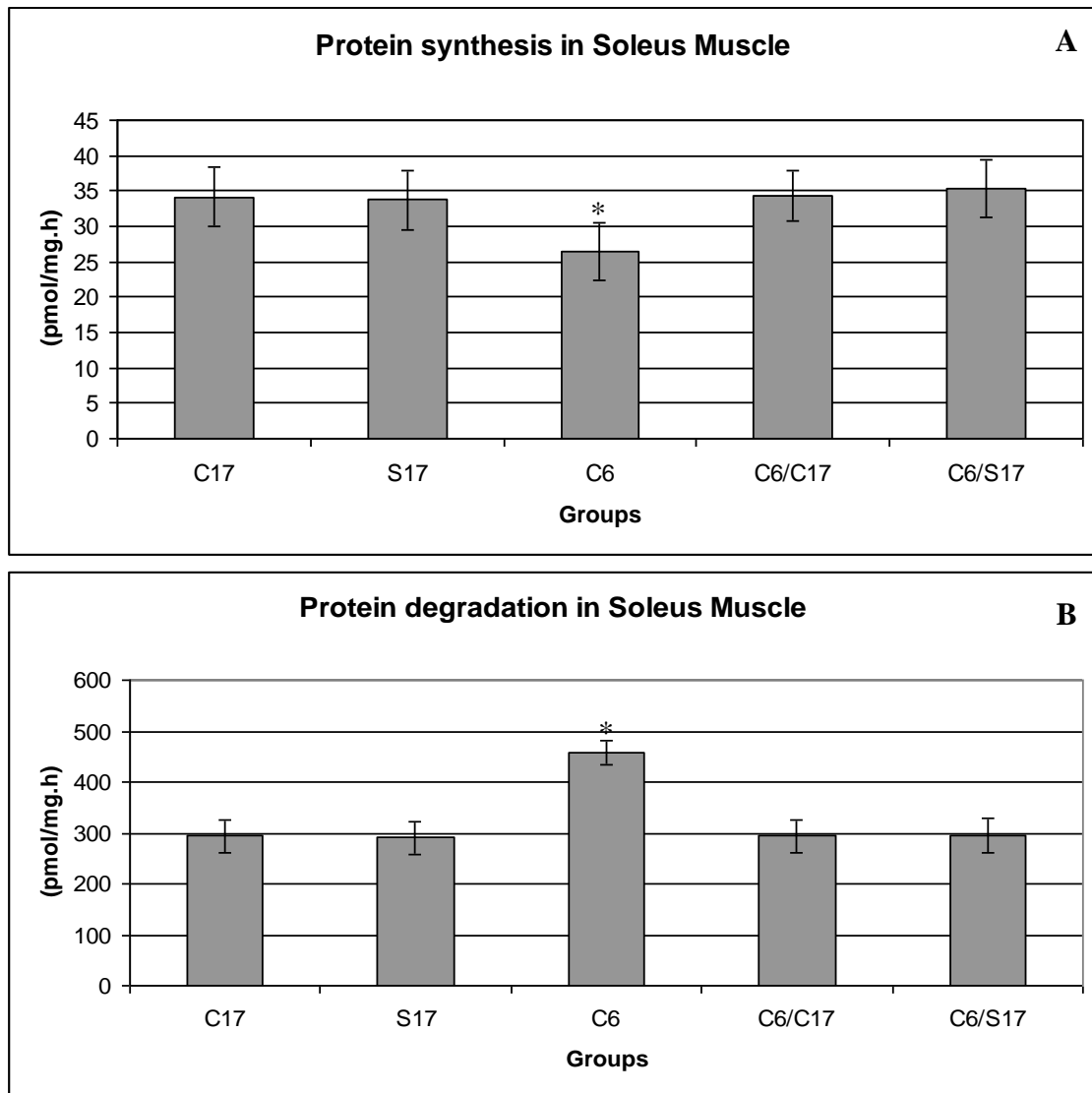


Figure 1. Protein (pmol/mg.h) (A) and degradation (pmol/mg.h) (B) rates in the soleus muscle of the animals (n=8/group) at the end of the experiment.

C17= Casein diet 16 weeks 17%; S17= *Spirulina* diet 16 weeks 17%; C6=Casein diet 16 weeks 6%; C6/C17=Casein diet 8 weeks 6% and Casein diet 8 weeks 17%; C6/S17=Casein diet 8 weeks 6% and *Spirulina* diet 8 weeks 17%

* Significantly different ($p < 0.05$, ANOVA two-way test) from the other groups.

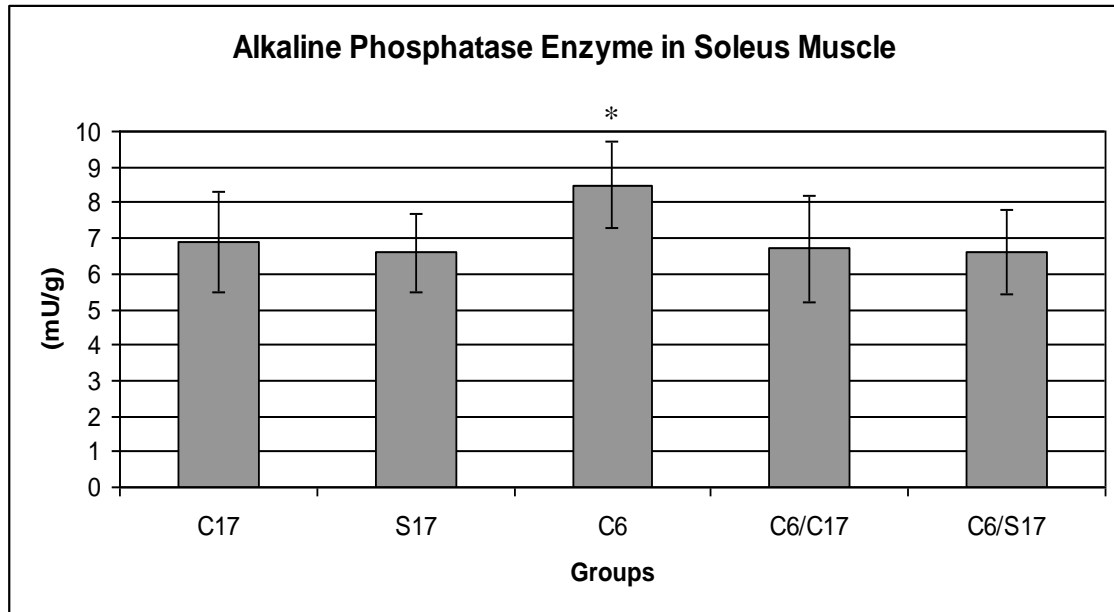


Figure 2. Alkaline phosphatase enzyme activity in soleus muscle of the animals (n=8/group) at the end of the experiment.

C17= Casein diet 16 weeks 17%; S17= *Spirulina* diet 16 weeks 17%; C6=Casein diet 16 weeks 6%; C6/C17=Casein diet 8 weeks 6% and Casein diet 8 weeks 17%; C6/S17=Casein diet 8 weeks 6% and *Spirulina* diet 8 weeks 17%

* Significantly different ($p < 0.05$, ANOVA two-way test) from the other groups.

4- Discussion

Although the prevalence of malnutrition is decreasing in Brazil, there is no single region where the stature deficit of children under five years of age is completely overcome. The purpose of reaching reference values of body growth (Table of National Center of Health Statistics – NCHS – recommended universally) is almost complete in some regions, but not in all (Monteiro, 2003). In some areas, protein deficiency is still prevalent and may increase the incidence and installation of Kwashiorkor (Batista Filho and Rissin, 2003). Thus, there is a great interest in developing more effective procedures for protein malnutrition treatment. These include the employment of new sources of protein in the diet, for instance the blue-green algae named *Spirulina*, in order to avoid and/or to recovery from malnutrition. *Spirulina* demonstrated to be both efficient in to attenuate the arterial hypertension in rats (Hernández et al, 2001) and in the treatment of some diseases, such as cancer (Nagasawa et al, 1989), malnutrition (Fica et al, 1984; Simpoire et al, 2006) and HIV-positive (Simpoire et al, 2005). In the present study, we verified the effects of this alga on skeletal muscle protein as well as on body growth of young rats previously submitted to dietary protein restriction.

The nutritional status of the animals fed casein (6% or 17%) or *Spirulina* (17%) was assessed by measuring the body weight and length and serum total protein and albumin levels, which are the traditional nutritional assessment indices for human subjects and also frequently used in animal studies (Prada et al, 2001; Mello et al, 2003).

Several studies have demonstrated that low body growth in presence of low serum albumin is often associated with medical complications (Jeejeebhoy, 2000), including protein malnutrition (Latorraca et al, 1998). Impaired body weight and body length gains, hypoalbuminemia, hypoproteinemia and high liver lipid and glycogen contents, as observed in our experimental rats maintained with the low protein diet are features commonly found in infantile kwashiorkor (Torun and Chew, 1994) and in protein malnourished experimental animals (Almeida and Mello, 2004). This indicates the adequacy of the animal model of protein malnutrition used in the present work.

As there was no significant difference both in food intake and protein efficiency ratio (PER) between rats fed the normal (C17) and the low casein (C6) diets, the model represents protein deficiency and not protein-energy deficiency (Ennouri et al, 2006). On the other hand, the food efficiency ratio (FER) appeared lower in the protein restricted group (C6) in relation to the C17 and S17 control groups.

The serum FFA concentration of the protein deficient rats (C6) of the present study was significantly lower in relation to animals fed the normal protein diets (C17 and S17). This confirms previous results from our group (Almeida and Mello, 2004). Studies using experimental animals showed that the 6-desaturase, a key enzyme in the synthesis of essential FA, appears inhibited in fasting and in insulin, protein and zinc deficiencies, conditions often observed in malnourished children (Golden and Golden, 1981).

In relation to liver lipid content, there was a significant increase in the protein restricted rats (C6) when compared to normal protein groups (C17 and S17). This confirms previous results from our group (Mello, 1995; Almeida and Mello, 2004) and seems to occur as a consequence of deficient transport of lipids to outside of the liver in protein-deficient organisms (Coward et al, 1972).

Body weight and length gains, serum protein, albumin and FFA concentrations as well as liver glycogen and total lipid contents were restored by both casein and *Spirulina* balanced diets in the recovered groups (C6/C17 and C6/S17). These positive

effects of *Spirulina* as protein source, similar to those of casein protein, for the recovery from protein malnutrition, were also observed by us in a previous study using adult rats (Alves et al, 2005), reinforcing the nutritional value of this alga.

According to Winick et al. (1972), the total number of cells in an organ can be estimated by determining total organ DNA content whereas the cell size can be estimated by calculating the weight/DNA or the protein/DNA ratios (Winick et al, (1972). Nutritional alterations during the period of hyperplasic and/or hypertrophic growth may result in altered number and/or size of cells in this tissue. Studies of the size of the muscles of animals submitted to postnatal malnutrition have revealed that this reduction is primarily attributable to a reduction in the volume of the fibers (hypotrophy) rather than to a reduction in the total number of fibers in the tissue (hypoplasia) (Rowe, 1968; Stichland et al, 1975). However, in the present study, total protein and DNA contents as well as the protein/DNA ratio in the soleus muscle were decreased in the animals previously submitted to protein malnutrition if compared to C17 and S17 groups, suggesting both hypoplasia and hypotrophy in the skeletal muscle. This situation was reverted in the C6/C17 and C6/S17 groups at the end of the experiment, indicating that *Spirulina* as the sole dietary protein source is adequate to promote hyperplasic and hypertrophic growth in the skeletal muscle of the young rat submitted to protein restriction.

To further analyze the consequences of protein malnutrition followed by a recovery period through ingestion of balanced casein and *Spirulina* diets on muscle protein, protein synthesis and degradation rates by the soleus muscle of the animals were evaluated in vitro. After 16 weeks of diet treatment, being 8 weeks of dietary protein restriction followed by 8 weeks of nutritional recovery, the rates of protein synthesis, which were reduced by the initial dietary protein restriction, were re-established by both casein and *Spirulina* balanced diets. At the end of the experiment, when analyzed the C6/C17 and C6/S17 groups and compared to C17 and S17 groups, no differences in the protein synthesis were observed. The same was observed in relation to protein degradation, i.e. these rates, which were increased by the initial protein restriction, returned to values similar to C17 and S17 groups at the end of the experiment. No differences in the muscle protein synthesis and degradation rates were found when the normal protein groups were compared (C17 and S17).

The alkaline phosphatase enzymes (APE) comprise a heterogeneous group of enzymes that are widely distributed in mammalian cells. They often are associated with cell membranes, but their exact physiologic function is unknown. Despite this, APE is a very useful serum biochemical indicator of liver disease. However, increases in the APE activity in certain tissues may reflect physiologic or pathologic changes beyond those of hepatic origin. For example, nonhepatic increases in tissue APE activity are found in young animals, in pregnant and lactating females, and in association with high fat or low protein diets (Fernandez and Kidney, 2007). In addition, the determination of APE in the skeletal muscle is a useful tool to estimate the cellular activity in this tissue (Calhau et al, 1999). In the present study, the activity of APE was higher in the soleus muscle of the protein malnourished rats (C6) when compared to the normal protein groups (C17 and S17). It may be hypothesized that the increase in the APE activity in soleus muscle of the C6 group might be a consequence, at least in part, of the protein turnover unbalance in this tissue, which was induced by low protein diet. On the other hand, the rats recovering from malnutrition (C6/C17 and C6/S17) had their muscle APE restored to control levels (C17 and S17), concomitant to the increase of the protein synthesis and the decrease of the protein degradation rates.

In summary, *Spirulina* proved to be an adequate protein source to recovery body weight and length gains of protein malnourished rats. In addition, muscle protein synthesis as well as muscle total protein and DNA contents were increased by the ingestion of the both experimental diets in young rats previously malnourished.

5- Conclusions

Taken together, the results of the present study suggest that:

- Feeding young rats with a low protein diet led to body growth arrest and skeletal muscle protein waste;
- Feeding the rats previously submitted to protein restriction with balanced casein or *Spirulina* diet showed efficient in counteracting the alterations in body growth and muscle protein induced by the protein restriction;
- Both diets proved be equally efficient in this sense. This fact demonstrates the potential value of protein proceeding from algae in protein malnutrition recovery.

Acknowledgments

The authors want to thank the Brazilian Foundation *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* for financial support.

6- References

- Albanese, A.A., Orto, L.A., 1963. Protein and amino acids. In: Albanese, A.A. ed. *Newer methods of nutritional biochemistry*. N.Y., Academic Press, v. I. cap. 1, 84.
- Almeida, P.B.L., Mello, M.A.R., 2004. Desnutrição protéica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte* 18(1), 17-30.
- Alves, A.P., Dâmaso, A.R., Dal Pai, V., 2008. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. *Journal of Pediatric (Rio J)* 84(3), 264-271.
- Alves, C.R., Voltarelli, F.A., Mello, M.A.R., 2005. *Spirulina* como fonte protéica na recuperação de ratos desnutridos: efeitos sobre o músculo esquelético. *EF Deportes* 86, 1-7.
- Batista Filho, M., Rissin, A., 2003. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Caderno de Saúde Pública* 19(1), 5181-5191.
- Branger, B., Cadudal, J.L., Delobel, M., Ouoba, H., Yameogo, P., Ouedraogo, D., 2003. *Spiruline* as a food supplement in case of infant malnutrition in Burkina-Faso. *Archives of Pediatric* 10(5), 424-431.
- Brasil, Ministério da Saúde., 1996. Pesquisa Nacional Sobre demografia e Saúde. Relatório preliminar, Brasília, p. 182.
- Calhau, C., Hipólito, R.C., Azevedo, I., 1999. Alkaline phosphatase and exchange surfaces. *Clinical Biochemistry* 32 (2), 153-154.
- Chen, H., Pan, S.S., 2005. Bioremediation potential of *Spirulina*: toxicity and biosorption studies of lead. *Journal of Zhejiang University Science B* 6(3), 171-174.

- Contreras, A., Herbert, D.C., Grubs, B.G., Cameron, I.L., 1979. Blue alga *Spirulina* as the sole dietary source of protein in sexually maturing rats. *Nutrition and Reproduction Interactive* 19(6), 749-763.
- Costa, D.A., De Morais, M.G., Dalcaton, F., Reichert, C., Durante, A.J., 2006. Simultaneous cultivation of *Spirulina* plantensis and the toxigenic cyanobacteria *microcystis aeruginosa*. *Naturforsch* 61(1-2), 105-110.
- Coward, W.A., Whitehead, R.G., 1972. Changes in serum b-lipoprotein concentration during the development of kwashiorkor and in recovery. *British Journal of Nutrition* 27, 383-389.
- Ennouri, M., Fetoui, H., Bourret, E., Zeghal, N., Guermazi, F., Attia, H., 2006. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 2. Influence of seed supplemented diet on rats. *Bioresearch Technology* 97, 2136–2140.
- Fernandez, N.J., Kidney, B.A., 2007. Alkaline Phosphatase: beyond the liver. *Veterinary Clinical Pathology* 36(3), 223-233.
- Fica, V., Olteanu, D., Oprescu, S., 1984. Use of *Spirulina* as an adjuvant nutrient factor in the therapy of the diseases accompanying a nutritional deficiency. *Revista de medicină internă, neurologie, psihiatrie, neurochirurgie, dermatovenerologie. Medicină internă* 36, 225-234.
- Fulks, R.M., Li, J.B., Goldberg, J.L., 1975. Effects of insulin, glucose, amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *Journal of Biology and Chemistry* 250, 290-298.
- Furst, P.T., 1978. *Spirulina*- Nutritious alga, once a staple of Aztec diets could feed many of the world's hungry people. *Human Nature* 3, 60-71.
- Galdino, R.S., Mello, M.A.R., Almeida, R.L., Almeida, C.C.S., 2001. Desnutrição protéico-calórica. In Dâmaso A. (ed) *Nutrição e exercício na prevenção de doenças*, Rio de Janeiro, MEDSI., pp. 35-46.
- Giles, A., Meyers, A., 1961. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 206 (1 n. 4975), 93.
- Golden, M.H.N., Golden, B.E., 1981. Effect of zinc supplementation on the dietary intake, rate of weight gain, and energy cost of tissue deposition in children recovering from severe malnutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 34, 900-908.

- Hadenshog, G., Hofsten, A., 1979. The ultra structure of *Spirulina plantensis*. A new source of microbial protein. *Physiology Plant* 23, 209-216.
- Hernández, A.R., Castillo, J.L.B., Oropeza, M.A.J., Zagoya, J.C.D., 2001. *Spirulina* maxima prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. *Life Science* 69, 1029-1037.
- Ihemelandu, E.C., 1985. Fibre number and sizes of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition. *Acta of Anatomy (Basel)* 121, 89-93.
- Jeejeebhoy, K.N., 2000. Nutritional assessment. *Nutrition* 16(7/8), 585-590.
- Kapoor, R., Metha, U., 1998. Supplementary effect of *Spirulina* on hematological status of rats during pregnancy and lactation. *Plant and Foods of Human Nutrition and Aliment* 29(6), 517-534.
- Kay, R.A., 1991. Micro algae as food and supplement. *Critical Review of Food Science and Nutrition* 30(6), 555-573.
- Latorraca, M.Q., Reis, M.B., Carneiro, E.M., Mello, M.A.R., Velloso, L.A., Saad, M.J., Boschero, A.C., 1998. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and early steps of insulin action in rats. *Journal of Nutrition* 128, 1643-1649.
- Li, Z.Y., Guo, S.Y., Li, L., Cai, M.Y., 2006. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina* plantensis in an air-lift photobioreactor. *Bioresearch and Technology* 98(3), 700-705.
- Lowry, O.H., Rosebroug, N.J., Farr, A.L., Randall, R.T., 1951. Protein measurement with the folinphenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* 193, 265-275.
- Mello, M.A.R., Luciano, E., Carneiro, E.M., Latorraca, M.Q., Oliveira, C.A.M., Boschero, A.C., 2003. Glucose homeostasis in pregnant rats submitted to dietary protein restriction. *Res Research communications in molecular pathology and pharmacology* 113-114, 229-246.
- Monteiro, C.A., 2003. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil: implicações para políticas públicas. *Sem Esp Fome e Pobr*, Rio de Janeiro.
- Nagasawa, H., Konishi, R., Sensui, N., Yamamoto, K., Ben-Amotz, A., 1989. An inhibition by beta carotene rich algae *Dunaliella* of spontaneous mammary tumourigenesis in mice. *Anticancer Research* 9, 71-82.

- Narayan, M.S., Manoj, G.P., Vatchravelo, K., Bhagralakshmi, N., Mahadevaswamy, M., 2005. Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina plantesis*. International Journal of Food and Science Nutrition 56(7), 521-528.
- Nascimento, O.J., Madi, K., Guedes e Silva, J.B., Soares Filho, P.J., Hahn, M.D., Couto, B., 1990. Considerações sobre o músculo estriado na desnutrição protéica. Arquivos de Neuropsiquiatria 48, 395-402.
- Nogueira, D.M., Strufaldi, B., Hirata, M., Abdalla, D.S., Hirata, R.D., 1990. (Eds) Métodos de Bioquímica Clínica, São Paulo, Pancas Editorial.
- Oliveira, F.L., Oliveira, A.S., Schimidt, B., Amâncio, O.M., 1999. Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1ª e 2ª gerações. Journal of Pediatric (Rio J) 75, 350-356.
- Prada, F.J., Luciano, E., Carneiro, E.M., Boschero, A.C., Mello, M.A.R., 2001. Protein deficiency attenuates the effects of alloxan on insulin secretion on glucose homeostasis in rats. Physiology and Chemical Physiology and Medicine NMR 33, 73-82.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C., 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final reports of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. Journal of Nutrition 123, 1939-1951.
- Rowe, R.W.D., 1968. Effect of low nutrition on size of striated muscle fibers in the mouse. The Journal of Experimental Zoology 167, 353-358.
- Salazar, M., Chamorro, G.A., Salazar, S., Steele, C.E., 1996. Effects of *Spirulina maxima* consumption on reproduction and peri and post natal development in rats. Food and Chemical Toxicology 34(4), 353-359.
- Sautier, C., Tremolieres, J., 1975. Food value of the *Spirulina* algae to man. Annals of Nutrition and Aliments 29(6), 517-534.
- Simpire, J., Kabore, F., Zongo, F., Dansou, D., Bere A., 2006. Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing *Spirulina* and misola. Nutrition Journal 23(5), 3-9.
- Simpire, J., Zongo, F., Kabore, F., Dansou, D., Bere, A., Nikiema, J.B., Pignatelli, S., Biondi, D.M., Ruberto, G., Musumecis, S., 2005. Nutrition

- rehabilitation of HIV-infected and HIV-negative undernourished children utilizing *Spirulina*. *Annals of Nutrition and Metabolism* 49(6), 373-380.
- Siu Lo, J.C.R., Taylor, A.W., 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of Applied Physiology* 8(2), 1970.
 - Stickland, N.C., Widdowson, E.M., Goldspink, G., Effects of severe energy and protein deficiencies on the fibers and nuclei in skeletal muscle of pigs. *British Journal of Nutrition* 34, 421-428.
 - Torun, B., Chew, F., 1994. Protein energy malnutrition. *Modern Nutrition and Health Diseases* 2, 950-976.
 - Tranquille, N., Emeis, J.J., Chambure, D., Binot, R., Tamponnet, C., 1994. *Spirulina* acceptability trials in rats. A study for the “Melissa” life-support system. *Advanced Space Research* 14 (11), 167-170.
 - Voltarelli, F.A., Marcondes, M.C.G., Voltarelli, V.A., Ribeiro, C., Mota, C.S.A., Stevanato, E., Mello, M.A.R., 2008. Muscle protein in growing rats fed *Spirulina* as the sole dietary protein source. *Medicine and Science in Sports Exercise* 40, S101-S102.
 - Voltarelli, F.A., Mello, M.A.R., Marcondes, M.C.C.G., 2003. *Spirulina* protein, body growth, and skeletal muscle protein metabolism in young rats. *Amino Acids* 35, 150.
 - Waalkes, T.P., Udenfriend, S., 1957. Tyrosine in plasma and tissues. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 50(5), 733-736.
 - Winick, M., Basel, J.A., Rosso, P., 1972. A Nutrition and cell growth. In: Winick M. *Nutrition and development*. John Wiley & Sons, New York, pp. 49-97.

10.5- Apresentação dos artigos científicos paralelos publicados. Os mesmos referem-se ao período de Estágio de Doutorando que o aluno realizou na Universidade do Porto – Faculdade de Ciência do Desporto – Porto – Portugal, no período de Março a Setembro de 2007 com o suporte financeiro da *CAPES* (Modalidade PDEE). Encontra-se em anexo, ainda, o Parecer referente ao período de Estágio do aluno emitido pelo Professor Supervisor daquela Universidade.

10.5.1- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; DUARTE, J.A.R. *Apoptose e exercício físico: efeitos sobre o músculo esquelético*. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano** (*Revisão da Literatura*). 12 (1): 13-19, 2008.

**Artigo de revisão**

Fabrício Azevedo Voltarelli¹
Maria Alice Rostom de Mello¹
José Alberto Ramos Duarte²

**APOPTOSE E EXERCÍCIO FÍSICO: EFEITOS SOBRE
O MÚSCULO ESQUELÉTICO****APOPTOSIS AND PHYSICAL EXERCISE: EFFECTS
ON SKELETAL MUSCLE****RESUMO**

Esta breve revisão irá discutir uma nova e excitante área em ciências do exercício, conhecida como o papel da apoptose ou morte celular programada no exercício. A morte celular por apoptose difere morfológica e bioquimicamente da morte celular por necrose, embora ambas pareçam ocorrer após o exercício. A ocorrência de apoptose acelerada tem sido relatada em uma grande variedade de doenças, tais como a AIDS e o mal de Alzheimer, bem como em problemas cardíacos relacionados com o envelhecimento. Por outro lado, falhas ao ativar essa regulação genética de morte celular pode resultar em câncer e em certas infecções virais. Aqui será discutido o fenômeno da apoptose, na musculatura esquelética, relacionado com o exercício físico, assim como a interação com a proteína HSP70. Nós especulamos que a apoptose induzida pelo exercício é um processo regulatório normal, que se torna útil no sentido de remover certas células lesadas com ausência de resposta inflamatória pronunciada, otimizando, assim, as funções do organismo.

Palavras-chave: Apoptose; Exercício; Músculo esquelético.

ABSTRACT

This brief review will discuss an exciting new area in exercise science, namely the role of apoptosis programmed cell death in exercise. Apoptotic cell death differs morphologically and biochemically from necrotic cell death, although both appear to occur after exercise. Accelerated apoptosis has been documented to occur in a variety of disease states, such as AIDS and Alzheimer's disease, as well as in the aging heart. In striking contrast, failure to activate this genetically regulated cell death may result in cancer and certain viral infections. Here, the apoptosis phenomenon will be discussed, as it occurs in skeletal muscle, and its relation to physical exercise, as well as the interaction with the HSP70 protein. We speculate that exercise-induced apoptosis is a normal regulatory process that serves to remove certain damaged cells without a pronounced inflammatory response, thus ensuring optimal organism function.

Key words: Apoptosis; Exercise; Skeletal muscle.

1 Universidade Estadual Paulista – UNESP CAMPUS RIO CLARO – Laboratório de Biodinâmica – Departamento de Educação Física

2 Faculdade do Desporto da Universidade do Porto (FDEF) – Portugal – Laboratório de Bioquímica do Exercício.

INTRODUÇÃO

A apoptose, uma forma de morte celular altamente regulada, é caracterizada por eventos morfológicos, bioquímicos e moleculares específicos¹. É essencial para o desenvolvimento normal de organismos multicelulares² e está envolvida no turnover celular em tecidos adultos saudáveis³. A apoptose também desempenha um papel crítico na remoção de células indesejáveis e potencialmente perigosas, tais como as células tumorais⁴ e células infectadas por vírus⁵. Desordens como o câncer, AIDS, doença de Alzheimer e artrites reumatóides são provavelmente, pelo menos em parte, resultantes de uma regulação ineficiente da apoptose². Nos últimos anos, a apoptose tem despertado o interesse de muitos cientistas do exercício porque, juntamente com a morte celular por necrose, evidências indicam que a morte celular por apoptose também ocorre com o exercício.

Há diferenças específicas entre morte celular por necrose e por apoptose que podem ser observadas e mensuradas. Necrose ocorre quando a célula sofre injúria letal e é caracterizada por inchamento, ruptura da célula e inflamação. Esse tipo de injúria é tipicamente observado com exercício excêntrico e é caracterizado pelo atraso no início dos estímulos/respostas musculares³. Apoptose, no entanto, é um fenômeno normal, geneticamente controlado e caracterizado pelo encolhimento da célula, invaginação e ruptura da membrana e condensação da cromatina. Além disso, a ativação de endonucleases e das caspases resulta em irreversibilidade da fragmentação do DNA com conseqüente fragmentação da célula em corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos são fagocitados, subseqüentemente, pelas células vizinhas ou por macrófagos^{6,7}. Um marcador freqüentemente utilizado para se determinar a apoptose é a fragmentação de DNA em partículas de oligonucleossomos de aproximadamente 180 pares de bases, as quais formam uma "escada" de DNA sob o gel de eletroforese. O entendimento das diferenças existentes entre apoptose e necrose pode gerar possíveis intervenções terapêuticas, com o intuito de reduzir a morte celular excessiva por apoptose.

Uma variedade de sinais internos e externos regulam a expressão de genes que controlam o início da apoptose^{2,8-10}. Internamente, genes expressam proteínas que iniciam a apoptose (ie., Bax, Faz, p53, etc.) e proteínas que inibem a mesma (Bcl-2, Bcl-XL), e o resultado para a célula (morte ou sobrevivência) depende da razão entre os genes expressados. Por exemplo, níveis elevados de Bcl-2 em relação à Bax promovem sobrevivência, enquanto que a razão inversa promove morte¹¹. Estes genes expressam suas proteínas específicas no núcleo (p53), mitocôndria (Bcl-2, Bcl-XL e Bax) e em outras organelas subcelulares.

O exercício extenuante intervém em vários fatores, os quais podem alterar a apoptose em vários tecidos. Atualmente há evidência de que a apoptose, induzida pelo exercício, ocorre em linfócitos e musculatura esquelética. Por exemplo, glicocorticóides, inibição do fator de crescimento, espécies reativas de oxigênio (EROs), aumento intracelular dos níveis de Ca²⁺ e fator

de necrose tumoral (TNF) são alguns sinais que podem induzir apoptose^{2,8,9}. Alguns desses fatores originam-se do ambiente extracelular (glicocorticóides, TNF) e interagem com proteínas intra ou extracelulares que podem disparar o sinal de morte celular. Aumentos na secreção de glicocorticóide, nas concentrações de cálcio intracelular e na produção de EROs têm sido observados durante exercício extenuante, mostrando assim, grande potencial para induzir apoptose^{3,12-14}.

Embora o mecanismo exato pelo qual a apoptose ocorre não esteja totalmente elucidado e que o mesmo pode diferir dependendo do tipo de célula ou estímulo, evidências sugerem que a mitocôndria desempenha um papel chave na regulação da apoptose em vertebrados (ver Figura 1). Aumento da produção de agentes oxidantes na mitocôndria de músculo esquelético, durante exercício agudo, tem sido observado e está intimamente relacionado com danos ao DNA e às proteínas^{16,14}. Quantidades significativas de DNA danificado poderiam alterar a expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas e iniciar o processo de apoptose. Além disso, outros fatores, tais como a produção de oxidantes e o decréscimo dos níveis de glutatona, podem estimular a mitocôndria a liberar proteínas ativadoras de caspase, tais como a citocromo-c e o fator de indução de apoptose (AIF). A liberação de citocromo-c pela mitocôndria para o citosol é um dos primeiros sinais da via de sinalização da apoptose. Citocromo-c citosólico ligar-se-á ao fator de ativação da apoptose protease-dependente (Apaf-1) e ao ATP. Esse complexo é capaz de ativar a caspase-9, a qual é responsável pelo início da cascata proteolítica de eventos, resultando assim em apoptose⁸.

Nós iremos revisar a fibra muscular esquelética, que parece ser susceptível à apoptose durante o exercício, e os mecanismos apoptóticos potencialmente envolvidos. Nós iremos também examinar se o exercício crônico (treinamento) pode prevenir a perda celular. Para além disso, nós iremos fornecer informações para futuras investigações para essa nova área pertencente à fisiologia do exercício, as quais podem resultar em consideráveis implicações sobre a saúde e doença. Por exemplo, descobrindo-se os mecanismos pelos quais a perda celular via apoptose, devido ao envelhecimento, ocorre, a mesma pode ser diminuída pelo treinamento físico e poderia ter implicações sobre as doenças caracterizadas pela atrofia, tanto do músculo cardíaco como da musculatura esquelética, nessa população.

Músculo esquelético e apoptose induzida pelo exercício

A atividade física prolongada pode causar danos ao músculo esquelético, com a atividade excêntrica (contrações seguidas de alongamento) sendo mais danosa em relação à atividade isométrica³. Anteriormente acreditava-se que o dano era devido, principalmente, aos processos inflamatórios e necróticos, mas evidências indicaram papel importante da apoptose em fibras musculares adultas durante e após exercício excêntrico^{10,18-20}.

Usando gel de eletroforese, observou-se

fragmentação do DNA em músculos de camundongos deficientes em distrofina (mdx) 48 horas após uma noite de corrida espontânea em roda de atividade^{19,20}. Além disso, ubiquitinação mionuclear (degradação proteica) aumentou tanto em camundongos corredores normais como em camundongos mdx, quando comparados aos animais sedentários. Ubiquitina, uma proteína de estresse elevadamente conservada, é encontrada em todas as células eucarióticas. Ela pode se ligar a várias proteínas celulares. Tal ocorrência significa, para a célula, que essas proteínas devem ser degradadas. Sandri et al.¹⁹ encontraram decréscimo nos níveis de Bcl-2 em camundongos mdx após o exercício. Baixos níveis dessa proteína mitocondrial anti-apoptótica podem, parcialmente, explicar a grande incidência de apoptose após o exercício agudo.

Apoptose também ocorre em músculos de camundongos normais, após exercício, como

evidenciada através, principalmente, de microscopia eletrônica para detectar características morfológicas de núcleos apoptóticos, TUNEL e eletroforese (gel) para detectar fragmentação do DNA^{9,16}. Western blotting de pró- e anti-proteínas apoptóticas mostrou níveis decrescidos de Bcl-2 em relação a Bax, imediatamente após o exercício, no entanto, a razão foi revertida após 96 horas do fim do exercício¹⁹. Essencialmente, isso pode promover morte celular imediatamente após o exercício, enquanto que a promoção da sobrevivência celular pode ocorrer 4 dias mais tarde.

Embora permaneça indefinido como e por que a apoptose é induzida na fibra muscular adulta após o exercício, há várias hipóteses plausíveis que requerem investigações futuras. Uma dessas hipóteses é que durante o exercício, com o metabolismo muscular aumentado em relação ao basal, há um aumento da produção das EROs. Quantidades significativas de

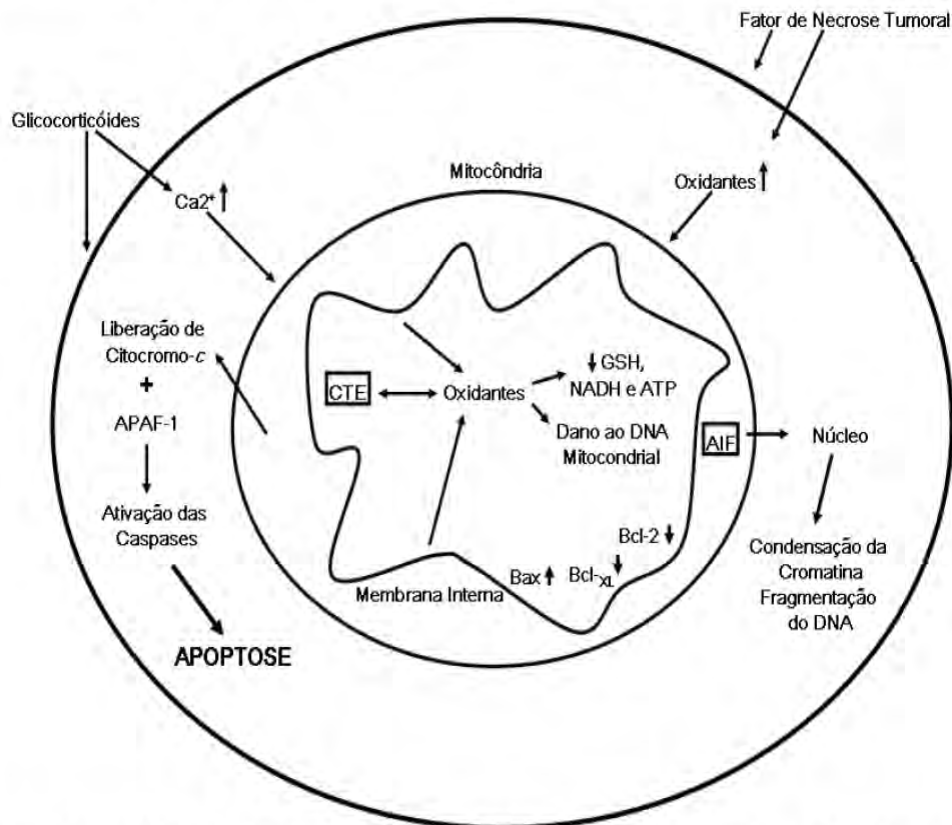


Figura 1. Apoptose e exercício: esquema simplificado sobre os possíveis sinais de apoptose ocorridos após o exercício. Exercício causa aumento na produção de agentes oxidantes através da cadeia de transporte de elétrons (CTE) ou através da elevação da concentração de Ca^{2+} . Agentes oxidantes, ou fatores ainda desconhecidos, poderiam ter impacto direto sobre os níveis de glutatona (GSH), ATP, NADH e sobre os danos oxidativos ao DNA. Outros fatores, tais como o fator de necrose tumoral e os glicocorticóides, podem ter ações similares ou operar por diferentes mecanismos que induzem à morte celular. Todos esses fatores podem afetar as proteínas mitocondriais, tais como Bcl-2, Bcl- $_{xL}$ e Bax (proteínas de check point para a morte celular) e levar ao aumento da liberação de citocromo-c a partir da mitocôndria. A liberação de citocromo-c ou, outras vias de sinalização ainda desconhecidas, podem ativar as caspases, resultando em apoptose (morte celular programada). Outras proteínas liberadas a partir do espaço intermembrana da mitocôndria podem ser caspase-independente e translocarem-se para o núcleo, causando fragmentação do DNA em grande escala. Sinais e proteínas responsáveis pela apoptose podem variar entre os diferentes tipos de células e podem, também, originarem-se a partir do espaço extra celular e do núcleo (Adaptada de Phaneuf e Leeuwenburgh¹⁷).

agentes oxidantes podem produzir danos ao DNA e desse modo, diretamente, induzir apoptose. Fibras do tipo I, as quais são predominantemente oxidativas, podem ser oprimidas pela quantidade de EROs produzidas e podem não ser capazes de efetivamente neutralizá-las. Além disso, o estresse do exercício eleva os níveis de catecolaminas, as quais promovem a indução da apoptose. O aumento das EROs e dos glicocorticóides, como resultado do exercício, poderiam então sinalizar a célula para submeter-se à apoptose. Evidência adicional em favor desta hipótese é que o treinamento, o qual tem sido capaz de sobre-regular certas enzimas antioxidantes²¹⁻²³ atenua, parcialmente, a perda de mionúcleo da musculatura esquelética após suspensão dos membros traseiros de animais²⁴. Esse importante estudo realizado por Allen et al.²⁴ também relatou que o GH e o IGF-1, agindo isoladamente ou combinados com o treinamento físico, preveniram a perda de mionúcleos após suspensão dos membros traseiros. Devido ao fato de as fibras musculares serem multinucleadas, elas podem diferir em sua resposta apoptótica se comparadas com células mononucleadas.

Para além dessas informações, a inatividade da musculatura esquelética devido à insuficiência cardíaca crônica poderia influenciar, potencialmente, a apoptose. Nesse sentido, uma interessante pesquisa mostrou que a apoptose ocorre nos miócitos da musculatura esquelética em cerca de 50% dos pacientes acometidos por insuficiência cardíaca crônica, possivelmente devido à inatividade²⁵. De maneira importante e considerável, pacientes que apresentaram miócitos da musculatura esquelética positivos para apoptose exibiram, como consequência, baixos níveis de VO_{2max} e expressões de Bcl-2 diminuídas, quando comparados com biópsias de sujeitos saudáveis. Os mecanismos pelos quais a apoptose é induzida na musculatura esquelética, submetida ao exercício e/ou à inatividade, ainda não foram totalmente elucidados, e é importante notar que eles parecem atuar de maneira diferente para cada situação.

A possibilidade de que a produção mitocondrial de agentes oxidantes durante o exercício exerce um efeito direto sobre a apoptose ainda não foi, na sua totalidade, investigada. Parece ser muito plausível que distúrbios na homeostase mitocondrial, isto é, danos ao DNA, lesão na membrana mitocondrial interna e aumento na concentração de cálcio, poderiam, eventualmente, resultar na liberação de fatores pró-apoptóticos, tais como a citocromo-c, a partir do espaço intermembrana. Entretanto, um importante estudo mostrou que o citosol da musculatura esquelética humana não possui a capacidade de ativar caspases tipo II mediadas pela via da citocromo-c²⁶. Fator de ativação da apoptose protease-dependente (Apaf-1) também não foi detectado na musculatura esquelética de humanos nesse mesmo estudo. Essas informações sugerem que a apoptose da musculatura esquelética humana pode não operar via mecanismo mitocondrial. No entanto, nesse estudo²⁶, as biópsias da musculatura esquelética foram realizadas em seres humanos na

condição de repouso e não em indivíduos submetidos ao exercício físico agudo. Nesse sentido, o exercício poderia ativar uma variedade de proteínas necessárias para a completa ativação das caspases.

Cai et al.²⁷ observaram o efeito do exercício (esteira rolante) realizado em diferentes intensidades (leve, moderada e exaustiva), sob o ponto de vista das alterações relacionadas à apoptose, no músculo gastrocnêmio de ratos. Esses autores verificaram que a apoptose foi observada somente nos músculos dos animais submetidos às intensidades moderada e intensa, alcançando os níveis mais elevados, após a realização do exercício, apenas no grupo de animais que efetuou exercício intenso. O índice de apoptose, ainda nesse mesmo estudo, continuou se elevando até o 1º e 3º dia após o término do exercício no grupo moderado e exaustivo, respectivamente. Os autores desse estudo preconizam que o exercício pode evocar a apoptose e acelerar a depuração celular por esse mecanismo, e o desequilíbrio entre esses dois eventos durante o exercício pode contribuir para a injúria da musculatura esquelética.

Em outro estudo, Siu et al.²⁸ investigaram o efeito da atividade física moderada e regular sobre a extensão da apoptose em músculo sóleo de ratos submetidos ou não ao treinamento em esteira rolante, durante 8 semanas (5 dias/semana). Os autores desse estudo observaram, no músculo sóleo dos animais treinados em relação aos sedentários, os seguintes resultados: a) aumento da expressão de Bcl-2; b) diminuição da expressão de Apaf-1 e c) diminuição dos níveis de mRNA/Bax. Tais achados sugerem que o treinamento físico, realizado de maneira moderada, pode atenuar a extensão da apoptose na musculatura esquelética de ratos.

Em síntese, a apoptose tem sido observada na musculatura após o exercício, o mecanismo preciso pelo qual ela acontece ainda é desconhecido e ainda não está totalmente elucidada a idéia de que as fibras musculares são, com absoluta certeza, completamente perdidas através do processo apoptótico ou se são apenas temporariamente “marcadas” com as características desse fenômeno.

HSP70, apoptose e exercício

HSPs (proteínas de choque térmico) são um grupo de proteínas extremamente induzidas por uma variedade de estresses, incluindo hipertermia, distúrbios no pH e estresse oxidativo. Há grande evidência, mostrando que as HSPs desempenham um papel importante na manutenção da integridade física e funcional da célula e, portanto, na sobrevivência da mesma. Entre as diferentes classes de HSPs, a família da HSP70 constitui a mais conservada e extensivamente estudada classe de HSPs. Tem-se sugerido recentemente que a HSP70 é uma potente proteína anti-apoptótica²⁹. Há evidências suportando a hipótese de que a HSP70 inibe a apoptose através da modulação da via mediada pela mitocôndria^{16,30}. Li et al.¹⁶ reportaram que a HSP70 inibe a apoptose, suprimindo a formação de apoptossomos, tendo um

efeito inibidor sobre a liberação de citocromo-c e sobre a ativação da caspase-3. O efeito supressivo da HSP70 sobre a formação de apoptossomos reduz a ativação da caspase-9 bem como a segmentação de caspase-3, portanto, diminuindo a ocorrência de apoptose e, subseqüentemente, a fragmentação nuclear. AIF, uma outra proteína (endonuclease) liberada pela mitocôndria, tem sido descrita, também, como uma das moléculas alvo envolvida na inibição da apoptose mediada pela HSP70^{31,32}. O efeito anti-apoptótico da HSP70 sobre AIF sugere que a HSP70 inibe a apoptose pela supressão das vias caspase-independente e –dependente.

Siu et al.²⁶ demonstraram que, após ratos serem submetidos ao treinamento físico moderado de longa duração, houve uma correlação positiva significativa existente entre as expressões de HSP70 e Bcl-2 e também entre os níveis transcripcionais dessas proteínas (mRNA) na musculatura esquelética dos animais. Esse mesmo estudo mostrou haver também correlação positiva significativa entre as expressões de Mn-SOD (enzima anti-oxidante), níveis transcripcionais de Bcl-2 e HSP70. Em outro estudo, o treinamento físico de 10 semanas demonstrou melhorar a capacidade anti-oxidante da musculatura esquelética de ratos, promovendo, assim, cardioproteção e redução de danos à musculatura esquelética^{33,34}. Embora o mecanismo molecular para a atenuação da apoptose induzida pelo exercício não esteja ainda totalmente elucidado, estes resultados estão de acordo com a hipótese de que a HSP70 e a Mn-SOD desempenham um papel importante no decréscimo da apoptose induzida pelo exercício em tecidos pós-mitóticos, tais como a musculatura esquelética.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A morte celular por apoptose induzida pelo exercício na musculatura esquelética exposta a específicos estresses (cálcio, glicocorticóides, radicais livres), pode ser um processo normal, utilizado para remover, parcialmente, as fibras danificadas. Exercício excessivo e/ou excêntrico pode causar danos mecânicos significativos, seguidos por processos inflamatórios, levando à necrose e à apoptose. A apoptose é um processo parcialmente reversível e, portanto, intervenções terapêuticas poderiam ser testadas para atenuar esse processo. Pesquisas são requeridas para investigar as alterações nas proteínas pró- e anti-apoptóticas durante o exercício de longa duração, nas suas diferentes intensidades e/ou cargas de trabalho. Alterações nessas proteínas de morte ou sobrevivência podem, possivelmente, explicar porque o treinamento físico previne, parcialmente, a perda de fibra e massa musculares que ocorre durante o processo de envelhecimento. Além disso, alguns pontos precisam ser esclarecidos, tais como: a) como exatamente as fibras musculares são perdidas durante o processo necrótico e apoptótico; b) quando exatamente o processo apoptótico torna-se reversível nesse tecido e c) qual a verdadeira relação

entre o fenômeno da apoptose e a HSP70. Estudos futuros são necessários para determinar quais sinais moleculares, precisamente, estão envolvidos com o fenômeno da apoptose na musculatura esquelética, durante o exercício a fim de desenvolver, com bases teórico-práticas sólidas, terapias para a proteção e restauração da força contrátil da fibra muscular nessas condições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449.
2. Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Sci Am* 1996; 275:80-87.
3. Carraro U, Franceschi C. Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise. *Aging Clin Exp Res* 1997; 9:19-34.
4. Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991; 65:1097-1098.
5. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76:777-779.
6. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.
7. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1366:151-165.
8. Green DR, Reed JC. Mitochondrial and apoptosis. *Science* 1998; 281:1309-1312.
9. Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* 1998; 252:1-15.
10. Podhorska-Okolow M, Sandri M, Zampieri S, Brun B, Rossini K, Carraro U. Apoptosis of myofibers and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropath Appl Neurobiol* 1998; 24:518-531.
11. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74:609-619.
12. Bejma J, Jr LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1999; 87:465-470.
13. Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107:1198-1205.
14. Leeuwenburgh C, Hansen PA, Holloszy JO, Heinecke JW. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Rad Biol Med* 1999; 27:186-192.
15. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25:218-224.
16. Li C, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2000; 275:25665-25671.
17. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 24:393-396.
18. Podhorska-Okolow M, Krajewska B, Carraro U, Zabel M. Apoptosis in mouse skeletal muscle after physical exercise. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; 37:127-128.
19. Sandri M, Podhorska-Okolow M, Geromel V. Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophin-deficient muscle of mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56:45-57.

20. Sandri M, Carraro M, Podhorska-Okolow M. Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Lett* 1995; 373:291-295.
21. Leeuwenburgh C, Hollander J, Fiebig R, Leichtweis S, Griffith M, Jr LL. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol* 1997; 272:363-369.
22. Powers SK, Criswell D, Lawler J. Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1993; 265:H2094-H2098.
23. Sen CK, Marin E, Kretzschmar M, Hanninen O. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol* 1992; 73:1265-1272.
24. Allen DL, Kinderman JK, Roy RR. Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol* 1997; 273:C579-C587.
25. Adams V, Jang H, Yu J. Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:959-965.
26. Burgess DH, Svensson M, Dandrea T. Human skeletal muscle cytosols are refractory to cytochrome c-dependent activation of type-II caspases and lack APAF-1. *Cell Death Differ* 1999; 6:256-261.
27. Cai BT, Yu B, Zhao JP, Zhang X. Exercises at different intensities and sequential changes of rat skeletal muscle cell apoptosis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2006; 26(7):1017-1029.
28. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J* 2004; 7:1-25.
29. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286:433-442.
30. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000; 2:476-483.
31. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maisse C, Daugas E, Zamzami N et al. Heat shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001; 3:839-843.
32. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397:441-446.
33. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31:987-997.
34. Powers SK, Lennon SL, Quindry J, Mehta JL. Exercise and cardioprotection. *Curr Opin Cardiol* 2002; 17:495-502.

Agradecimentos

Os autores fazem um agradecimento especial à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao presente trabalho (Processo número: PDEE/388706-5).

Endereço para Correspondência

Professor Mestre Fabrício Azevedo Voltarelli
Universidade Estadual Paulista – Unesp Campus Rio Claro
Laboratório de Biodinâmica – Departamento de Educação Física
Avenida 24-A, 1515 – Bairro: Bela Vista
Rio Claro – SP – CEP: 13.506-900
e-mail: faunesp8@yahoo.com.br

Recebido em 16/05/07
Revisado em 14/06/07
Aprovado em 01/07/07

10.5.2- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; DUARTE, J.A.R. *Atrofia Muscular Esquelética e Modelos Experimentais: Apoptose e Alterações Histológicas, Bioquímicas e Metabólicas. Revista da Educação Física (UEM) (Revisão da Literatura)*. 18(1): 85-95, 2007.

ARTIGOS DE REVISÃO

**ATROFIA MUSCULAR ESQUELÉTICA E MODELOS EXPERIMENTAIS:
APOPTOSE E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E METABÓLICAS¹****SKELETAL MUSCLE ATROPHY AND EXPERIMENTAL MODELS: APOPTOSIS AND
HISTOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND METABOLIC CHANGES**

Fabrício Azevedo Voltarelli*
Maria Alice Rostom de Mello*
José Alberto Ramos Duarte**

RESUMO

A atrofia muscular esquelética tem-se constituído, nos últimos anos, como objeto de investigação pelo fato de se encontrar associada a várias patologias. No entanto, os mecanismos subjacentes às alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais induzidas por esta entidade anatomopatológica permanecem, ainda, por esclarecer. Efetivamente, têm sido recentemente apresentadas algumas hipóteses, salientando-se as alterações no *turnover* proteico, no padrão de expressão das isoformas da miosina de cadeia pesada e na preponderância das vias metabólicas activadas. Adicionalmente, quer a diminuição do número de mionúcleos, quer a redução do domínio nuclear, parecem ser fenômenos que acompanham o desenvolvimento da resposta trófica. Neste sentido, vários estudos experimentais sugerem que a apoptose parece ter uma função importante na regulação destes acontecimentos. Dada a relevância e implicação clínica da atrofia muscular na capacidade funcional e, conseqüentemente, na qualidade de vida do ser humano, torna-se fundamental compreender de forma detalhada este processo.

Palavras-chave: Atrofia. Apoptose. Modelos experimentais. Musculatura esquelética.

INTRODUÇÃO

O processo de atrofia muscular esquelética constitui uma resposta do tecido muscular em situações de tensão e/ou de carga mecânica reduzida, na tentativa de manter um funcionamento eficiente e ajustado às novas exigências funcionais. Desta forma, este processo pode ser visto como uma expressão da deterioração muscular em resposta a alterações funcionais ou patológicas. A atrofia muscular esquelética constitui um processo altamente ordenado e regulado com inúmeras alterações metabólicas, bioquímicas e estruturais que repercutem na funcionalidade dos músculos afetados. A estrutura e a funcionalidade

muscular esquelética são condicionadas pela atividade proprioceptiva, pela enervação motora, pela carga mecânica, pela realização de ciclos de estiramento/encurtamento e pela mobilidade das articulações. Quando algum desses fatores é comprometido, a atrofia desenvolve-se de forma imediata e drástica, deteriorando a qualidade de vida humana, dado que esta é condicionada pelas atividades que o indivíduo é capaz de realizar. Desta maneira, o conhecimento detalhado dos fenômenos que envolvem a atrofia muscular, referentes principalmente à apoptose em níveis celular e molecular e às alterações histológicas, bioquímicas e metabólicas, poderá ter importantes repercussões no desenvolvimento de medidas preventivas para a sua manifestação,

¹ Apoio: Capes.

* Universidade Estadual Paulista-Unesp, Campus Rio Claro.

* * Faculdade de Desporto da Universidade do Porto, Portugal.

assim como na definição de protocolos de reabilitação.

MODELOS EXPERIMENTAIS

No sentido de estudar os mecanismos subjacentes ao processo de atrofia muscular esquelética, têm sido desenvolvidos vários modelos animais capazes de induzir experimentalmente, salientando-se os modelos de suspensão do membro traseiro, de vôo espacial e de imobilização.

Suspensão dos membros traseiros

Este modelo de indução de atrofia muscular esquelética foi inicialmente desenvolvido em 1979, com a finalidade de simular um ambiente de ausência de peso, nomeadamente para mimetizar o vôo espacial. Constitui o modelo experimental de eleição, aceite pela comunidade científica, para simular o vôo espacial, prevendo-se um aumento da sua utilização durante a era da estação espacial. (MOREY-HOLTON; GLOBUS, 2002). Este modelo de hipocinesia e de hipodinâmica, muito utilizado no estudo do efeito da ausência da carga, também se mostrou útil na investigação da resposta fisiológica de ratos e camundongos em processos de recuperação associados à reposição de carga (MOREY-HOLTON; GLOBUS, 2002). As adaptações fisiológicas que ocorrem neste modelo são semelhantes às observadas em outros modelos experimentais de uso muscular reduzido, como o vôo espacial e a imobilização, o que lhe confere uma utilidade dupla: se, por um lado, permite estudar sistemas fisiológicos sob condições de microgravidade simulada, por outro, as alterações são comparáveis a outros modelos com atividade muscular reduzida.

Vôo espacial

O vôo espacial constitui, à semelhança da suspensão dos membros traseiros, um modelo de ativação elétrica reduzida dos músculos posturais (TALMADGE, 2000). O número de elementos neurais da função neuromotora é rápida e profundamente afetado pelo vôo espacial, sendo que algumas destas adaptações persistem durante dias ou mesmo semanas após o

mesmo (EDGERTON et al., 1995). Segundo esses autores, o componente neural parece, assim, possuir um papel decisivo para o detrimento da *performance* associado ao vôo espacial (EDGERTON et al., 1995).

Os programas espaciais demonstram que a atrofia muscular em ratos ocorre rapidamente, verificando-se reduções de massa muscular superiores a 37% numa semana (FITTS; RILEY; WINDRCK, 2001), observáveis em músculos extensores, mas não em outros músculos associados ao movimento (MOREY-HOLTON; GLOBUS, 2002). Neste modelo, à semelhança do anterior, as forças da reação à gravidade são eliminadas, permitindo simultaneamente que os músculos permaneçam funcionalmente ativos (HADDAD et al., 2003).

Imobilização

Outro modelo considerado adequado para estudar os mecanismos responsáveis pela atrofia muscular em animais é a imobilização decorrente de distintos contextos clínicos, uma vez que neste processo espera-se que os fatores subjacentes à etiologia sejam expressos de forma distinta durante as primeiras fases (ST-AMAND et al., 2001). A atrofia muscular associada a este modelo surge rapidamente, é reversível e afeta de forma idêntica os diferentes músculos. Neste modelo, os músculos-alvo são imobilizados numa posição fixa por inativação/imobilização das articulações. Deste modo, o músculo é mantido numa posição neutra, encurtada ou alongada (HADDAD et al., 2003). Todos estes modelos têm em comum o fato de minimizarem a quantidade de atividade induzida pela carga mecânica desempenhada pelo músculo.

LESÃO

A concentração plasmática de algumas proteínas miofibrilares é, normalmente, utilizada para estimar a ocorrência de lesão do músculo esquelético e a sua magnitude (SORICHTER et al., 1997), salientando-se a creatina kinase (CK), a aspartato aminotransferase, a lactato desidrogenase, a mioglobina e a troponina (KASPER; TALBOT; GAINES, 2002). O aumento dos seus níveis plasmáticos constitui

uma indicação de que as células musculares atingidas (atrofiadas) perderam a capacidade de regular a permeabilidade destas proteínas (KAUHANEN; LEIVO; MICHELSSON, 1993). Das referidas, a CK é um dos marcadores mais usados na clínica para diagnóstico de lesão muscular. Numa situação de atrofia, como, por exemplo, na suspensão dos membros traseiros, a CK é sobre-expressa, o que a torna um bom marcador da adaptação do músculo esquelético ao desuso (CROS et al., 1999), sendo por isso a mais freqüentemente utilizada. No entanto, a troponina I (TnI) tem sido referida como marcador de lesão mais específico na detecção de lesão do músculo esquelético (sTnI) e cardíaco (cTnI) (KASPER; TALBOT; GAINES, 2002). Esta proteína tem sido mais utilizada na monitorização de lesões ao nível do músculo cardíaco, apesar de existirem estudos que validam a sua aplicação ao nível do músculo esquelético e a consideram o marcador de lesão mais adequado, dada a sua especificidade.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

A atrofia muscular caracteriza-se histologicamente por uma diminuição da densidade de volume miofibrilar relativamente aos volumes mitocondrial e do retículo sarcoplasmático. As fibras lentas oxidativas, mais susceptíveis a atrofia, apresentam fibrilas desintegradas, com as linhas-Z estendidas e lesão mitocondrial (CAIOZZO et al., 1996). As mitocôndrias tornam-se menores, de forma mais globular e com poucas cristas (LU et al., 1997). À medida que a área transversa diminui, os núcleos encontram-se mais freqüentemente no centro das fibras (KASPER; TALBOT; GAINES, 2002), e a rodear alguns destes observam-se halos de citoplasma sem miofibrilas. A condensação e a fragmentação da cromatina nuclear são características das fibras atroficas (SMITH et al., 2000). O retículo sarcoplasmático torna-se mais irregular e perde a sua íntima relação com os túbulos T ao nível das junções ansiotrópico-isotrópicas (LU; HUANG, CARLSON, 1997). O número de sarcômeros funcionais em paralelo, aparentemente, tem tendência a diminuir (CAIOZZO et al., 1996).

A redução progressiva da razão capilar/fibra muscular, característica do processo atrofico, pode induzir ou contribuir, pelo menos em parte, para a degeneração das fibras musculares existentes. Kano et al. (2000) constataram que a atrofia decorrente de suspensão do membro traseiro em ratos é acompanhada por uma diminuição do diâmetro luminal capilar, bem como por uma redução do número absoluto de capilares. Também Edgerton et al. (1995) registraram uma diminuição significativa do número de capilares nos diferentes tipos de fibra (I, IIA e IIB) após 11 dias de vôo espacial.

Caiozzo et al. (1996) observaram ainda que o vôo espacial induz no músculo sóleo um aumento do tecido conjuntivo ou fluido intersticial. Também a desnervação de músculo de rato e camundongo adulto induz inicialmente à proliferação do tecido conjuntivo e de células satélites (SCHMALBRUCH; LEWIS, 2000). A morfologia das células satélite em músculos desnervados sugere que muitas destas abandonam o seu estado quiescente e tornam-se ativadas, estando potencialmente disponíveis para a restauração das fibras musculares atroficas existentes ou para a regeneração de novas fibras musculares (LU; HUANG, CARLSON, 1997). Apesar desta aparente estimulação inicial, (DARR; SCHULTZ, 1989) registram uma diminuição do número e da atividade proliferativa das células satélites após 3 dias de suspensão do membro traseiro nos músculos sóleo e extensor digitório longo (EDL) de ratos. A diminuição do teor em células-satélite e do seu potencial proliferativo parece estar subjacente à diminuição da capacidade adaptativa e regenerativa que se observa, por exemplo, no envelhecimento muscular (PUTMAN et al., 2001).

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E METABÓLICAS

A molécula de miosina de cadeia pesada (MHC) é a principal proteína estrutural e reguladora que serve de motor molecular no controle das propriedades contráteis intrínsecas da fibra muscular (ADAMS et al., 2001). O músculo esquelético é essencialmente caracterizado pelas isoformas MHC específicas. Conhecem-se quatro isoformas

MHC expressas em níveis elevados nos músculos de roedores adultos: MHC I (ou β -cardíaca), MHC IIa, MHC IIx (ou MHC II_d) e MHC IIb. A expressão singular de cada uma destas isoformas na fibra resulta no aparecimento de quatro diferentes tipos de fibra (TALMADGE, 2000). Assim, as fibras tipo I são compostas por MHC I, típica das fibras resistentes à fadiga, e são caracterizadas por um baixo consumo de ATP e uma reduzida velocidade de encurtamento. As fibras tipo IIa e IIb são constituídas por MHC IIa e IIb, respectivamente. Essas isoformas rápidas são características das fibras que apresentam um elevado consumo de ATP uma maior velocidade de encurtamento, e são mais fatigáveis. As fibras tipo IIx são constituídas por isoformas MHC IIx. Nos humanos e nos gatos, a isoforma MHC IIb não é expressa, pelo que não se observam fibras do tipo IIb (TALMADGE, 2000). Em adição às fibras que contêm apenas uma das isoformas MHC, também se conhecem fibras “híbridas”, que co-expressam duas ou mais isoformas MHC (ANDERSEN et al., 1999). O conhecimento da composição da fibra muscular em isoformas MHC é importante, dado que esta condiciona certas propriedades contráteis, como a velocidade máxima de encurtamento, e propriedades intrínsecas geradoras de força.

Na atrofia muscular estão descritas alterações na expressão das isoformas MHC, observáveis em situações distintas tais como na suspensão dos membros traseiros em ratos, durante o vôo espacial em ratos, humanos e macacos *rhesus* (CAIOZZO et al., 1996). Talmadge et al. (2000) observaram que tanto a suspensão dos membros traseiros como o vôo espacial induzem, no músculo sóleo de ratos *Wistar*, um aumento da proporção de fibras contendo MHC tipo II em detrimento das tipo I. Cros et al. (1999), além de confirmarem estas alterações no teor das isoformas MHC no músculo sóleo, sugeriram ainda que a resposta deste músculo à ausência de carga é um processo contínuo, uma vez que as curvas de variação da percentagem de isoformas MHC não se estabilizam mesmo após 4 semanas de suspensão dos membros traseiros.

Ohira et al. (1999) observaram, no músculo esquelético humano submetido à ausência de carga, um aumento no número de fibras musculares que expressam isoformas MHC rápidas. As fibras tipo I são as mais afetadas por alterações crônicas ao nível da atividade neuromuscular, talvez porque estas fibras são normalmente as mais ativas. No entanto é de considerar que, no músculo sóleo, os outros tipos de fibra representam uma fração muito pequena da população total de fibras, pelo que a contribuição das adaptações destas fibras minoritárias, ao nível do músculo como um todo, parece ser fisiologicamente insignificante (OHIRA et al., 1999).

Nas regiões vermelhas de músculos mistos, como o gastrocnêmio, também se verifica um aumento da proporção de fibras que contêm MHC tipo II (TALMADGE; ROY, EDGERTON, 1996). No músculo vasto intermédio observaram-se, o tipo de fibras, alterações qualitativamente semelhantes às do sóleo, mas menores em magnitude. Nos músculos plantar e tibial anterior não se registram as alterações na composição das fibras musculares esperadas, atendendo a que a composição das fibras destes músculos é basicamente constituída por fibras musculares rápidas (CAIOZZO et al., 1996). A forma como é regulada esta alteração das isoformas MHC é uma questão que tem sido bastante abordada nos estudos de atrofia muscular, mas para a qual ainda não se conhecem certezas absolutas. Paralelamente à atrofia muscular observada, por exemplo, durante a suspensão dos membros traseiros, ocorre alteração da expressão gênica (STEVENS et al., 1999). Numa situação de ausência de carga, o teor proteico e os níveis de mRNA das isoformas que estão sobre-reguladas são condicionadas pela atrofia do músculo. Por exemplo, numa situação de atrofia acentuada observa-se uma diminuição dos níveis de MHC IIa numa altura em que os níveis de mRNA continuam a aumentar, o que poderá ser explicado pela regulação pós-transcricional (HORTOBAGYI et al., 2000).

As modificações na expressão das MHCs são acompanhadas por um aumento na razão das atividades das enzimas glicolíticas/oxida-

tivas, não só pela redução da capacidade oxidativa do músculo esquelético, mas também pelo aumento acentuado do metabolismo glicolítico (CROS et al., 1999). As enzimas metabólicas, como a creatina quinase muscular ou a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, são altamente expressas no músculo sóleo imobilizado, dando indicação do elevado potencial glicolítico e da baixa resistência à fadiga que este músculo adquiriu (THOMASON; BOOTH, 1990). Considerando-se que no músculo esquelético, em resposta a alterações de sobrecarga, as adaptações metabólicas precedem as adaptações estruturais, o aumento destas enzimas glicolíticas no processo atrofico pode ser visto como um bom marcador do desuso muscular. Gamrin et al. (1998) observaram que a oxidação do piruvato e a atividade de marcadores enzimáticos do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) não são afetadas pela ausência de gravidade, o que sugere que a reduzida capacidade de oxidar gorduras apresentada pelos músculos atroficos não é devida a uma diminuição do fluxo de substratos do ciclo TCA. Nos ratos, e talvez nos humanos, os modelos de ausência de peso provocam um aumento do teor de glicogênio no músculo em repouso cuja depleção, bem como a produção de lactato, é acelerada durante a atividade. Este aumento da dependência do glicogênio está associado a uma capacidade reduzida de oxidar ácidos graxos livres (di PRAMPERO; NARICI, 2003), possivelmente causada pelo efeito inibitório do substrato de uma enzima limitante da velocidade da oxidação desses ácidos.

Os dados metabólicos obtidos de músculos de ratos expostos a vôo espacial mostram que a integridade metabólica de músculos lentos, como o sóleo, é mantida razoavelmente bem até 7 a 12,5 dias, mesmo quando a atrofia é severa. No entanto, observam-se alterações de proteínas enzimáticas mitocondriais em músculos predominantemente rápidos após 7 a 14 dias de vôo espacial. Tem sido sugerido que algumas destas modificações enzimáticas estão relacionadas com uma alteração da sensibilidade à insulina, podendo resultar de uma maior dependência do metabolismo

anaeróbio de hidratos de carbono, comparativamente ao normal (GAMRIN et al., 1998).

Uma adaptação típica à diminuição do uso muscular provocada por desnervação, imobilização e suspensão dos membros traseiros é a redução dos níveis de proteínas mitocondriais, com conseqüente perda da funcionalidade da mitocôndria (CONNOR; HOOD, 1998). ST-Amând et al. (2001) verificaram uma diminuição da expressão gênica de enzimas envolvidas na produção de ATP, tais como as subunidades β , δ , γ da ATP sintase e da subunidade VIII-h da citocromo c oxidase, entre outras. Dada a diminuição do fornecimento de energia, a glicólise pode ser promovida pela diminuição da atividade da fosfatase 1 que inativa a fosforilase, enzima responsável pela degradação do glicogênio para glicose (ST-AMAND et al., 2001).

FENÔMENO DA APOPTOSE

A apoptose é um processo de morte celular individual, regulado pela ativação de determinados genes. Algumas das características morfológicas da apoptose incluem a condensação nuclear e citoplasmática, a fragmentação da célula em corpos apoptóticos, que posteriormente são fagocitados, e a ausência de inflamação local (VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003). Essas alterações são devidas à ativação de endonucleases e de proteases citoplasmáticas, num processo modulado por vários genes reguladores com função pró- e antiapoptótica (SMITH et al., 2000).

Embora, nas células em geral, a apoptose possa ocorrer por vários mecanismos (Figura 1), a mitocôndria tem sido implicada como um dos seus principais centros reguladores (GABAI; SHERMAN, 2002). Tem sido sugerido que estímulos celulares endógenos, tais como níveis elevados de cálcio ou de espécies reativas de oxigênio (ROS), possam desencadear a apoptose pela via dependente de citocromo c (PRIMEAU; ADIHETTY; HOOD, 2002). Outras vias requerem uma ativação alternativa para iniciar a cascata das

caspases (KIDD, 1998), as principais responsáveis pelas maiores alterações bioquímicas e morfológicas que ocorrem durante a apoptose (REHM et al., 2002). Por exemplo, a ligação do TNF- α (Fator de Necrose Tumoral) ao seu receptor celular pode induzir a apoptose numa célula pela ativação da procaspase-8, a qual, por sua vez, cliva e ativa a procaspase-3. Também o *estresse* do retículo endoplasmático pode contribuir parcialmente para a apoptose, ao liberar cálcio para o citoplasma, ativando assim a procaspase-12. A ativação das caspases leva à reorganização do citoesqueleto, interrompe a replicação e reparação do DNA, quebra a estrutura nuclear e desintegra a célula em corpos apoptóticos (DIRKS; LEEUWENBURGH, 2002).

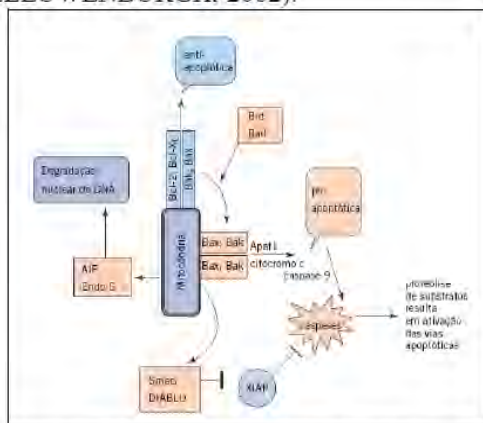


Figura 1 - Esquema simplificado das vias sinalizadoras celulares que induzem à morte celular por apoptose (XIAP - proteína inibidora da apoptose; Smac - segundo ativador mitocondrial das caspases; DIABLO - proteína de ligação ao XIAP com baixo ponto isoeletrônico; Apaf 1 - fator ativador da apoptose; Citocromo c; AIF - fator indutor da apoptose; EndoG - Endonuclease G; Bcl-2 - família de proteínas originalmente identificadas em linfomas de células B: Bax/Bak/Bid/Bad e Bcl-2/Bcl-X_L - proteínas da família Bcl-2 com ação pró- e anti-apoptótica, respectivamente).

As fibras esqueléticas são únicas no fato de serem verdadeiramente multinucleadas. A presença de múltiplos núcleos num citoplasma comum e não dividido levanta questões

intrigantes relativamente ao possível papel dos mionúcleos na adaptação do músculo a exigências funcionais variáveis. Têm surgido alguns estudos que procuram analisar o papel dos mionúcleos na adaptação do músculo esquelético em situações de carga alterada (ALLEN; ROY, EDGERTON, 1999). Numa fibra muscular esquelética multinucleada, cada núcleo controla uma porção de fibra pela qual é rodeado numa relação designada *domínio nuclear* (ALLEN et al., 1995), que consiste no volume de citoplasma da miofibrila regulado pelos produtos dos genes de um dado mionúcleo. A diminuição do tamanho da fibra pode estar associada a uma diminuição do número total de mionúcleos, a uma diminuição do tamanho de cada domínio mionuclear ou a ambos os efeitos. Alguns autores (ALLEN; ROY, EDGERTON, 1999) constataram que a diminuição do volume da fibra se deve a uma diminuição do tamanho do domínio mionuclear. Mais recentemente, Mitchell e Pavlath (2001) sugeriram que durante a atrofia, dado que as exigências transcricionais e traducionais colocadas aos mionúcleos são atenuadas, as fibras respondem pela eliminação destes, mantendo assim um domínio mionuclear constante. Alguns investigadores sugerem ainda que os mionúcleos individuais, em miofibras adultas de controle ou em regeneração, são capazes de transcrição independente (ALLEN; ROY, EDGERTON, 1999). Tudo indica que a transcrição seja espaço-temporalmente distinta em mionúcleos individuais e que ocorra de uma forma estocástica ou pulsativa. Cada mionúcleo individual pode expressar proteínas diferentes das dos mionúcleos vizinhos, o que sugere que os mionúcleos respondem diferentemente a estímulos diversos (ALLEN; ROY, EDGERTON, 1999). Adicionalmente, constatou-se que a resposta mionuclear é específica do tipo de fibra. Diversos estudos (ALLEN et al., 1996) registram uma maior diminuição do número de mionúcleos em fibras que expressam MHC (miosina de cadeia pesada) tipo I, relativamente às tipo II, numa situação de carga diminuída. A análise de vários dados experimentais sugere que uma diminuição no número de mionúcleos pode preceder uma mudança completa da expressão de MHCs lentas para rápidas.

Os mecanismos responsáveis pela perda de mionúcleos durante condições de atrofia muscular não estão bem definidos, nem é claro como é que os mionúcleos individuais podem ser eliminados sem a destruição de todos os núcleos ou de toda a miofibrila. Os resultados de estudos recentes (BORISOV; CARLSON, 2000; CARRARO et al., 2002) mostraram que, na desnervação permanente a longo prazo, a morte celular necrótica e apoptótica ocorre a uma velocidade significativa, contribuindo para a atrofia muscular. A apoptose, que se caracteriza pela destruição do núcleo, está envolvida na remodelação de tecidos durante situações fisiológicas, tais como o desenvolvimento embrionário e o controle do número de células em tecidos proliferativos, e durante estados patológicos, tais como a doença e a lesão (ADAMS et al., 2001; ALLEN; ROY, EDGERTON, 1999). No entanto, a definição da importância relativa da apoptose nuclear na fibra muscular é substancialmente complicada pela presença de centenas de mionúcleos em cada fibra muscular. Alguns núcleos, numa única célula, podem ser marcados para a morte, enquanto outros poderão não ser afetados (ADAMS et al., 2001). Então, uma forma modificada de “morte nuclear” com a destruição do domínio correspondente sem a subsequente destruição total da fibra, poderá ser responsável pela eliminação de mionúcleos das fibras multinucleadas (PRIMEAU; ADHIHETTY, P. J.; HOOD., 2002). Mesmo antes de o termo “apoptose” ter sido introduzido na ciência, era descrita uma série de anormalidades ultra-estruturais mionucleares após a desnervação a longo prazo, que incluía a condensação da cromatina, a contração e a fragmentação nuclear (ADAMS et al., 2001). De fato, a apoptose de mionúcleos individuais tem sido registrada numa série de estados patológicos musculares; por exemplo, foi observada em camundongos *mdx* distróficos (ROSSINI et al., 2000) e no músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca (LIBERA et al., 1999). Allen, Roy e Edgerton (1999) quantificaram a incidência de núcleos positivos por marcação TDT (*terminal desoxinucleotidil transferase*), um indicador da fragmentação da dupla cadeia do DNA sugestiva da apoptose, em músculos sóleo de ratos-controle

e com suspensão do membro traseiro. O número de núcleos TDT positivos total era significativamente maior em ratos com suspensão do membro traseiro relativamente ao controle. Também utilizando-se microscopia confocal, foi observado um número significativamente maior de mionúcleos morfológicamente anormais em músculos de ratos com suspensão do membro traseiro (MITCHELL; PAVLATH, 2001). Estas observações, com outras de estudos utilizando marcadores nucleares apoptóticos, suportam a hipótese de que a eliminação apoptótica dos mionúcleos constitui um mecanismo que contribui para a diminuição do número destes observada durante a atrofia da fibra muscular esquelética (TEWS, 2002). Este fenômeno é acompanhado por um aumento dos níveis de caspase-3 e por uma diminuição dos níveis de Bcl-2 (LIBERA et al., 1999), uma importante proteína antiapoptótica, envolvida na regulação da liberação do citocromo c pela mitocôndria (VERMEULEN et al., 2003). Sabe-se que a enzima caspase-8 desempenha papel determinante na ativação da apoptose independente da mitocôndria, pois ativa a enzima caspase-3, que por sua vez efetua o processo apoptótico propriamente dito, levando as células à morte. Por essa razão é considerada uma enzima ativadora, e não especificamente efetora. No entanto, caspase-8 parece contribuir para a morte mionuclear do músculo sóleo de ratos com membros suspensos, provavelmente ativada pela produção aumentada de Fator de Necrose Tumoral α (ADHIHETTY; HOOD, 2003). Adicionalmente, caspase-8 pode amplificar a cascata proteolítica pela clivagem do fator citoplasmático Bid, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, em pequenos fragmentos (15Kda) chamados de Bid truncados (tBid). Na mitocôndria, tBid interage com Bax e induz à liberação de citocromo c (BENCHOUA et al., 2002; ADHIHETTY; HOOD, 2003). Benchoua et al. (2002) sugeriram que a caspase-8 pode atuar também como efetora ao nível nuclear, uma vez que cliva PARP-2, um membro da família poli (ADP-ribose) polimerase envolvido no reparo do DNA. Então, caspase-8 pode ser vista não só como uma protease iniciadora, mas também como uma caspase efetora e amplificadora.

Enquanto muitos estudos mostram que a cascata das caspases desempenha papel importante e inquestionável nos sinais apoptóticos de transdução em músculos de ratos submetidos à suspensão de seus membros traseiros, tem sido também sugerido que a apoptose pode ser executada sem a participação das caspases (ADHINETTY; HOOD, 2003; SIU et al., 2005). Sinalização independente de caspase é conduzida principalmente por fatores apoptóticos específicos abrigados na mitocôndria (i.e. AIF e endonuclease G) que são liberados durante a apoptose (SIU et al., 2005). A liberação de AIF através do espaço intermembranas fornece uma canalização molecular direta entre a mitocôndria e a degradação nuclear / fragmentação de DNA. Ferreira et al. (2007 - dados não publicados) observaram fragmentação apoptótica de DNA, aumento da razão Bax/Bcl-2, liberação mitocondrial de AIF, atividade aumentada das caspases-3 e -8 em músculos sóleo de camundongos durante 48 horas de suspensão do membro traseiro. Esses resultados comprovaram indicações prévias de que apoptose associada à mitocôndria é ativada no músculo esquelético, pelas condições de retirada de carga, com contribuições de vias extrínsecas. Uma vez que a maioria dos parâmetros utilizados em investigações relacionando atrofia/desuso e apoptose não sejam específicos de mionúcleo, é possível que os núcleos de outras células além das fibras musculares (i.e. células endoteliais, fibroblastos) podem também contribuir com os resultados obtidos em estudo dessa natureza, a partir do princípio que eles também são incluídos na homogeneização do tecido muscular (SMITH et al., 2000).

Miosina: Embora algumas proteínas solúveis não sejam reguladas por um domínio, a miosina é limitada ao seu domínio nuclear. Esse conceito é muito importante na explicação e interpretação das desordens musculares e na expressão genética destas células (HIKIDA et al., 1997). A diminuição da atividade transcripcional, observada em situações de microgravidade, pode resultar de uma redução da atividade transcripcional por mionúcleo, de uma diminuição do número de mionúcleos por fibra ou de ambas as causas (ALLEN et al., 1996).

Primeau, Adhinetty e Hood (2002) sugerem que, no músculo humano, as fibras do tipo I estão mais protegidas da ocorrência da apoptose, pelo fato de terem um maior teor mitocondrial e, conseqüentemente, um maior índice de Bcl-2. No entanto, este efeito poderá ser contrariado pela maior velocidade de produção de ROS que se verifica nesse tipo de fibras. Efetivamente, as fibras do tipo I evidenciam um maior grau de atrofia relativamente às do tipo II, numa situação de ausência de carga (HIKIDA et al., 1997; PRIMEAU; ADHINETTY; HOOD, 2002). Alguns estudos mostram um maior número de núcleos em fibras lentas comparativamente às rápidas, o que pode estar relacionado com uma maior velocidade de *turnover* proteico que ocorre nas fibras tipo I. Nos mamíferos, estas fibras são as primeiras a serem recrutadas entre os vários tipos de fibra, resultando em uma maior carga metabólica para as fibras do tipo I relativamente às do tipo II, o que talvez requeira um maior controle nuclear (e correspondentemente um domínio menor) do que nas fibras rápidas do tipo II, que são menos freqüentemente recrutadas (HIKIDA et al., 1997). Por outro lado, alguns autores (LIBERA et al., 1999; VESCOVO; AMBROSIO; DALLA LIBERA, 2001) verificaram que, em sujeitos com insuficiência cardíaca, os músculos rápidos são mais susceptíveis à ocorrência da apoptose.

O aumento da co-expressão de MHC em fibras de músculos sóleo, verificado após vôo espacial e suspensão do membro traseiro, representa um passo na transformação das fibras musculares lentas em rápidas. No entanto, desconhece-se se a co-expressão observada por Allen et al. (1996) é devida à co-expressão de todas as MHCs por todos os núcleos, se é devida a uma expressão heterogênea das diferentes MHCs por diferentes mionúcleos ao longo da fibra ou se é devida à conversão de todos os mionúcleos para expressão da nova MHC, antes da degradação completa, por apoptose, da MHC original. Os resultados de Allen et al. (1996) sugerem que aproximadamente 19% das fibras dos animais submetidos ao vôo espacial expressam alguma MHC neonatal nas fibras que também expressam MHC adultas. Porque essas fibras não são significativamente

diferentes em tamanho das fibras controle, é provável que sejam fibras reexpressando MHC neonatal. Esta reexpressão de uma isoforma MHC de desenvolvimento pode ser devida à fusão de células satélites às fibras existentes, embora esta possibilidade não seja defendida por alguns autores, que sugerem que a expressão de MHC neonatal reflete uma reexpressão de mionúcleos adultos existentes (ALLEN et al., 1996). Por exemplo, Dupont-Versteegden et al. (1999) defendem que os sinais que promovem a ativação das células satélites numa situação de isolamento da medula espinal são pouco claros, dado que não ocorre uma lesão muscular clara. Mozdiak, Pulvermacher e Schultz (2001) verificaram que a suspensão do membro traseiro reduz a atividade mitótica das células satélites, inibe a expansão do tamanho da unidade de DNA e induz à atrofia no músculo esquelético, provavelmente com grande contribuição do processo apoptótico.

CONCLUSÕES

O músculo esquelético pode ser visto como uma estrutura dinâmica, uma vez que as suas células alteram as propriedades em função das

exigências funcionais. Durante os últimos 30 anos, tem-se notado um interesse crescente pelo papel do suporte postural e da atividade neuromuscular na regulação das propriedades estruturais, funcionais, bioquímicas e moleculares do músculo esquelético. Para o efeito, têm sido utilizados vários modelos experimentais, salientando-se a suspensão dos membros traseiros, o vôo espacial e a imobilização. Estes modelos resultam numa acentuada atrofia dos músculos envolvidos e na transformação das fibras fenotipicamente lentas em fibras rápidas, acompanhada por um aumento acentuado do metabolismo glicolítico.

O debate das possíveis causas da atrofia muscular esquelética continua em aberto. Várias hipóteses têm sido levantadas, desde perda da função anabólica a alterações do fluxo sanguíneo e ativação de citocinas como o TNF- α . Efetivamente, a perda acentuada de proteína e de massa muscular que caracteriza a atrofia parece resultar de um severo desequilíbrio entre as vias de síntese e de degradação proteica. A este nível é de salientar o papel das calpaínas e do complexo ubiquitina-proteossoma. A atrofia muscular é acompanhada de uma redução do número médio de mionúcleos por fibra e o fenômeno da apoptose parece estar subjacente a esta eliminação regulada de mionúcleos.

SKELETAL MUSCLE ATROPHY AND EXPERIMENTAL MODELS: APOPTOSIS AND HISTOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND METABOLIC CHANGES

ABSTRACT

Skeletal muscle atrophy is closely associated to many clinical disorders. For this reason, atrophy has been the focus of several clinical and basic research studies in the last decades. However, the mechanisms behind atrophy-induced morphologic, biochemical and functional alterations are still currently not well understood. Indeed, several possibilities regarding its physiopathology have been envisioned including unbalanced protein turnover, changes in the myosin heavy chain expression pattern and in the metabolic shift towards glycolytic pathway. In addition, the reduction of both myonuclear number and myonuclear domain size also suggest that apoptosis may be imperative in the regulation of these events. Give the clinical importance of this topic concerning the improved quality of life and functional ability, this issue needs to be addressed in greater detail.

Key words: Atrophy. Apoptosis. Experimental models. Skeletal muscle.

REFERÊNCIAS

ADAMS, V. et al. Apoptosis in skeletal muscle. *Front Bioscience*, v. 6, p. D1-D11, 2001

ADHIHETTY, P. J.; HOOD, D. A. Mechanisms of apoptosis in skeletal muscle. *Basic Applied Physiology*, v. 13, p. 171-179, 2003

ALLEN, D. L. et al. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *Journal of Applied Physiology*, v. 78, no. 5, p. 1969-1976, 1995.

ALLEN, D. L.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve*, v. 22, no. 10, p. 1350-1360, 1999.

ALLEN, D. L. et al. Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers

- after spaceflight. **Journal Applied Physiology**, v. 81, no. 1, p. 145-151, 1996.
- ANDERSEN, J. L. et al. Bed rest increases the amount of mismatched fibers in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 86, no. 2, p. 455-460, 1999.
- BENCHOUA, A. et al. Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactive poly (ADP-ribose) polymerase-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 34217-34222, 2002.
- BORISOV, A. B.; CARLSON, B. M. Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis. **Anatomic Recourses**, v. 258, no. 3, p. 305-318, 2000.
- CAIOZZO, V. J. et al. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, no. 1, p. 123-132, 1996.
- CARRARO, U. et al. Induced myogenesis in long-term permanent denervation: perspective role in functional electrical stimulation of denervated legs in humans. **Basic Applied Myology**, no. 12, p. 53-63, 2002.
- CONNOR, M. K.; HOOD, D. A. Effect of microgravity on the expression of mitochondrial enzymes in rat cardiac and skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, no. 2, p. 593-598, 1998.
- CROS, N. et al. Up regulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. **American Journal of Physiology**, no. 276 (2 Pt 2), p. R308-316, 1999.
- DARR, K. C.; SCHULTZ, E. Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. **Journal of Applied Physiology**, v. 67, no. 5, p. 1827-1834, 1989.
- di PRAMPERO, P. E.; NARICI, M.V. Muscles in microgravity: from fibres to human motion. **Journal of Biomechanics**, v. 36, no. 3, p. 403-412, 2003.
- DIRKS, A.; LEEUWENBURGH, C. Apoptosis in skeletal muscle with aging. **American Journal of Physiology and Regulation of Integrated Comparative Physiology**, v. 282, no. 2, p. R519-527, 2002.
- DUPONT-VERSTEEGDEN, E. E. et al. Activated satellite cells fail to restore myonuclear number in spinal cord transected and exercised rats. **American Journal of Physiology**, v. 277 (3 Pt 1), p. C589-597, 1999.
- EDGERTON, V. R.; ZHOU, M.Y.; OHIRA, Y.; KLITGAARD, H.; JIANG, B.; BELL, G.; HARRIS, B.; SALTIN, B.; GOLLNICK, P.D.; ROY, R.R. Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. **Journal of Applied Physiology**, v. 78, no. 5, p. 1733-1739, 1995.
- FITTS, R. H.; RILEY, D. R.; WIDRICK, J. J. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. **Journal of Experimental Biology**, v. 204 (Pt 18), p. 3201-3208, 2001.
- GABAI, V. L.; SHERMAN, M.Y. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, no. 4, p. 1743-1748, 2002.
- GAMRIN, L. et al. The effect of unloading on protein synthesis in human skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavia**, v. 163, no. 4, p. 369-377, 1998.
- HADDAD, F. et al. Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, no. 2, p. 791-802, 2003.
- HIKIDA, R. S. et al. Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fibers. **Anatomic Recourses**, v. 247, no. 3, p. 350-354, 1997.
- HORTOBAGYI, T. et al. Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. **Journal of Physiology**, v. 524 (Pt 1), p. 293-304, 2000.
- KANO, Y. et al. Changes in capillary luminal diameter in rat soleus muscle after hind-limb suspension. **Acta Physiologica Scandinavia**, v. 169, no. 4, p. 271-276, 2000.
- KASPER, C. E.; TALBOT, L. A.; GAINES, J. M. Skeletal muscle damage and recovery. **AACN Clinical Issues**, v. 13, no. 2, p. 237-247, 2002.
- KAUHANEN, S.; LEIVO, I.; MICHELSSON, J. E. Early muscle changes after immobilization. An experimental study on muscle damage. **Clinical Orthopedic**, v. 297, p. 44-50, 1993.
- KIDD, V. J. Proteolytic activities that mediate apoptosis. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 533-573, 1998.
- LIBERA, L. D. et al. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. **American Journal of Physiology**, v. 277 (5 Pt 1), p. C982-986, 1999.
- LU, D. X.; HUANG, S. K.; CARLSON, B. M. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. **Anatomic Recourses**, v. 248, no. 3, p. 355-365, 1997.
- MITCHELL, P. O.; PAVLATH, G. K. A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. **American Journal of Physiology and Cell Physiology**, v. 281, no. 5, p. C1706-1715, 2001.
- MOREY-HOLTON, E. R.; GLOBUS, R. K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, no. 4, p. 1367-1377, 2002.
- MOZDZIAK, P. E.; PULVERMACHER, P. M.; SCHULTZ, E. Muscle regeneration during hindlimb unloading results in a reduction in muscle size after reloading. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, no. 1, p. 183-190, 2001.
- OHIRA, Y. et al. Myonuclear domain and myosin phenotype in human soleus after bed rest with or without

- loading. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, no. 5, p. 1776-1785, 1999.
- PRIMEAU, A. J.; ADHIHETTY, P. J.; HOOD, D. A. Apoptosis in heart and skeletal muscle. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 27, no. 4, p. 349-395, 2002.
- PUTMAN, C. T. et al. Fiber-type transitions and satellite cell activation in low-frequency-stimulated muscles of young and aging rats. **Journal of Gerontology A Biological Science and Medicine Science**, v. 56, no. 12, p. B510-519, 2001.
- REHM, M. et al. Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, no. 27, p. 24506-24514, 2002.
- ROSSINI, K. D. A. et al. Time-Course of Exercise and Apoptosis in Dystrophin-deficient Muscle of Mice. **Basic Applied Myology**, v. 10, no. 1/2, p. 33-38, 2000.
- SCHMALBRUCH, H.; LEWIS, D.M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. **Muscle Nerve**, v. 23, no. 4, p. 617-626, 2000.
- SIU, P. M. et al. Aging influences cellular and molecular responses of apoptosis to skeletal muscle unloading. **American Journal of Physiology and Cell Physiology**, v. 288, p. C338-349, 2005.
- SMITH, H. K. et al. Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. **Cell Tissue Research**, v. 302, no. 2, p. 235-241, 2000.
- SORICHTER, S. et al. Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, no. 4, p. 1076-1082, 1997.
- ST-AMAND, J. et al. Characterization of control and immobilized skeletal muscle: an overview from genetic engineering. **Faseb Journal**, v. 15, no. 3, p. 684-692, 2001.
- STEVENS, L. et al. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in single fibers of unloaded rat soleus muscle. **FEBS Letter**, v. 463, no. 1-2, p. 15-18, 1999.
- TALMADGE, R. J. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. **Muscle Nerve**, v. 23, no. 5, p. 661-679, 2000.
- TALMADGE, R. J.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R. Distribution of myosin heavy chain isoforms in non-weight-bearing rat soleus muscle fibers. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, no. 6, p. 2540-2546, 1996.
- TEWS, D. S. Apoptosis and muscle fibre loss in neuromuscular disorders. **Neuromuscular Disorder**, v. 12, no. 7-8, p. 613-622, 2002.
- THOMASON, D. B.; BOOTH, F. W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. **Journal of Applied Physiology**, v. 68, no. 1, p. 1-12, 1990.
- VERMEULEN, K. et al. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**, v. 36, no. 3, p. 165-175, 2003.
- VESCOVO, G.; AMBROSIO, G. B.; DALLA LIBERA, L. Apoptosis and changes in contractile protein pattern in the skeletal muscle in heart failure. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 171, no. 3, p. 305-310, 2001.

Recebido em 28/03/07

Revisado em 22/05/07

Aceito em 05/06/07

Endereço para correspondência: Fabrício Azevedo Voltarelli. Departamento de Educação Física, Av. 24 A., 1515, Bela Vista, CEP 13506-900, Rio Claro-SP, Brasil. E-mail: faunesp8@yahoo.com.br

10.5.3- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R; DUARTE, J.A.R. *Apoptose e sarcopenia do músculo esquelético no envelhecimento. Revista Motriz (RioClaro) (Revisão da Literatura)*. 13(2): 137-144, 2007.

Artigo de Revisão

Apoptose e sarcopenia do músculo esquelético no envelhecimento

Fabrício Azevedo Voltarelli¹
Maria Alice Rostom de Mello¹
José Alberto Ramos Duarte²

¹Laboratório de Biodinâmica - Departamento de Educação Física UNESP Rio Claro SP Brasil

²Laboratório de Bioquímica do Exercício - Faculdade do Desporto da Universidade do Porto Portugal

Resumo: Embora os mecanismos exatos que envolvem a sarcopenia estejam longe de serem desvendados, o acúmulo de evidências pré-clínicas sugerem que a perda de miócitos via apoptose, relacionada à idade, pode representar um mecanismo chave que conduz ao início e progressão da perda muscular. Além disso, a apoptose tem sido observada em ratos idosos acometidos pela atrofia muscular induzida pela retirada da carga. A apoptose do músculo esquelético está atualmente sob intensa investigação, com um foco particular sobre o papel desempenhado pela mitocôndria. Aqui, nós iremos revisar as mais recentes evidências da apoptose muscular e suas modulações através de diferentes intervenções.

Palavras-chave: Envelhecimento. Sarcopenia. Músculo esquelético. Apoptose. Mitocôndria.

Apoptosis and sarcopenia of skeletal muscle at aging

Abstract: Although the exact mechanisms underlying sarcopenia are far to be unveiled, accumulating preclinical evidence suggests that an age-related acceleration of myocytes loss via apoptosis might represent a key mechanism driving the onset and progression of muscle loss. Furthermore, increased levels of apoptosis have also been reported in old rats undergoing acute muscle atrophy subsequent to muscle unloading. Several signaling pathways of skeletal muscle apoptosis are currently under intensive investigation, with a particular focus on the role played by mitochondria. Here, we will review the most recent evidence regarding various pathways of muscle apoptosis and their modulation by several interventions.

Key Words: Aging. Sarcopenia. Skeletal muscle. Apoptosis. Mitochondria.

Introdução

O envelhecimento é relacionado com o declínio progressivo da massa muscular, força e qualidade da execução do movimento (i.e., contração debilitada), condição plenamente conhecida como sarcopenia do envelhecimento. Essas mudanças relacionadas com a idade têm sido reportadas até mesmo entre sujeitos saudáveis e fisicamente ativos e a taxa de perda muscular tem sido estimada na escala de 1-2% de perda por ano, após os 50 anos de idade (HUGHES et al., 2002). A sarcopenia é uma condição altamente prevalente. Em um estudo realizado por Baumgartner et al. (1998), estimou-se que 25% dos idosos abaixo dos 70 anos de idade e 40% dos idosos com 80 anos de idade, ou mais, mostraram-se sarcopênicos. Além disso, estima-se que a prevalência dessa síndrome aumente dramaticamente com o passar dos anos, devido ao progressivo envelhecimento das populações ocidentais. A sarcopenia representa um fator de risco

poderoso para a fragilidade, perda de independência e inabilidade física de sujeitos idosos (ROUBENOFF, 2000). Para além disso, a diminuição da força muscular tem sido considerada um fator preditivo no que diz respeito a incidentes relacionados com a inabilidade física e com as mortes decorrentes destes acidentes em idades avançadas (RANTANEN et al., 1999; METTER et al., 2002). Além disso, essa incapacidade de realizar movimentos com segurança, resultante da perda de massa muscular, está estreitamente relacionada com a baixa qualidade de vida desses sujeitos (alimentação, infra-estrutura, vida social) e mais cuidados no que se refere à saúde do idoso são necessários (FRIED; GURALNIK, 1997). O impacto econômico da sarcopenia, além de sua correlação com fatores prejudiciais direto à saúde, é extremamente oneroso, uma vez que estimou-se que os custos com a saúde atribuídos à sarcopenia nos Estados Unidos da América (EUA), no ano de

2000, foi de US\$18,5 bilhões (JANSSEN et al., 2004). Acredita-se que essa despesa aumente significativamente como consequência do envelhecimento progressivo da população. Assim, o entendimento dos mecanismos que levam à perda muscular e à inabilidade física, com o avançar da idade, representa uma prioridade de saúde pública mundial.

Sarcopenia: mecanismos possivelmente envolvidos

A despeito da considerável carga tributária socio-econômica associada à sarcopenia, os possíveis mecanismos fisiopatológicos que dão início à perda muscular e subsequente inabilidade fisiológica em idosos são ainda pouco conhecidos. Estudos epidemiológicos segeriram fatores que contribuem para a sarcopenia, incluindo alterações neurais e hormonais (SZULC et al., 2004), nutrição inadequada (DREYER; VOLPI, 2005), baixo grau de inflamação crônica (VISSER et al., 2002) e inatividade física (SZULC et al., 2004). A partir de uma perspectiva histológica, a sarcopenia é caracterizada por uma diminuição no tamanho e no número das fibras, com perda preferencial para fibras do tipo II (glicolíticas) (LARSSON et al., 1978). Ao nível celular, grande número de evidências indica que a perda acelerada de miócitos relacionada com a idade, via apoptose, pode representar um mecanismo chave que, por sua vez, conduz ao início e à progressão da perda muscular (DIRKS; LEEUWENBURGH, 2002; DUPONT-VERSTEEGDEN, 2005). Apoptose é um programa de suicídio celular, evolutivamente conservado, estritamente regulado e executado através de vias de sinalização finamente controladas. Em organismos multicelulares, a apoptose é essencial para a embriogênese, desenvolvimento e para a manutenção da homeostase dos tecidos em indivíduos adultos (i.e., *turnover* celular, remoção de células que sofreram oncogênese, células infectadas por vírus e células auto-imune reativas) (ALISON; SARRAF, 1992). Além disso, tem sido proposto que apoptose acelerada ou células pós-mitóticas insubstituíveis, tais como os neurônios, fibra muscular esquelética e miócitos cardíacos, podem contribuir para a perda de função relacionada à idade (POLLACK et al., 2002). Com respeito à apoptose, o músculo esquelético apresenta característica única em relação aos outros tecidos, isto é, por ser multinucleado, ele pode sofrer apoptose individual de seu núcleo bem como morte celular por completo. Nesse cenário, acredita-se que a perda de massa muscular, relacionada à idade, pode ser ocasionada pela eliminação de núcleos através do mecanismo de apoptose.

Papel da apoptose na perda de músculo esquelético relacionada com a idade

A apoptose é executada através de vias de sinalização específicas, eventualmente levando à fragmentação do DNA, condensação nuclear, proteólise, invaginação inespecífica da membrana e fragmentação celular, com formação de corpos apoptóticos, os quais são então fagocitados por macrófagos ou células vizinhas. Com respeito ao executor final da morte celular, dois mecanismos distintos da apoptose são descritos, nomeados de via caspase-independente e via apoptose caspase-dependente (Figura 1). Esta última é executada através das caspases, as quais são endoproteases integradas à execução final da morte celular (DANIAL; KORSMEYER, 2004). As caspases estão normalmente presentes no citoplasma como precursores inativos (pro-caspases), as quais podem ser ativadas pela dimerização e segmentação proteolítica. Em uma sequência de eventos semelhantes à coagulação sanguínea, o início da apoptose dispara a “cascata das caspases”, na qual as caspases “iniciadoras” são ativadas (i.e., caspase-8, caspase-9, caspase-12). Por sua vez, estas ativam as caspases “efetadoras” (i.e., caspase-3, caspase-6, caspase-7), as quais realizam os verdadeiros eventos proteolíticos e fragmentação do DNA (via DNAase ativada por caspase) que, finalmente, resulta em degradação da célula. O mecanismo apoptótico caspase-independente é executado via liberação de mediadores a partir da mitocôndria (i.e., fator de indução da apoptose e endonuclease G) que são capazes de produzir, diretamente, fragmentação de DNA em grande escala. A mitocôndria é atualmente considerada o centro-chave para a indução e regulação da apoptose. Recentemente, Kujoth et al. (2005) investigaram o envolvimento da disfunção da mitocôndria no envelhecimento, usando modelo de camundongo expressando versão deficiente da DNA polimerase γ mitocondrial. Estes animais apresentaram um aumento na taxa de mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) e tal resultado foi associado com sinais de envelhecimento prematuro e diminuição na proliferação celular. Interessantemente, o acúmulo de mtDNA foi também correlacionado com a aceleração da apoptose em vários tecidos, incluindo o músculo esquelético. Tem-se conhecimento que sob certos estímulos, muito bem estabelecidos (i.e., danos causados por acúmulo de mtDNA, *stress* oxidativo e privação de fatores de crescimento), a mitocôndria pode induzir apoptose tanto via caspase-dependente como via caspase-independente. Por exemplo, a mitocôndria pode liberar citocromo *c*, o qual liga-se a dATP e ao fator de ativação da protease-apoptose (Apaf-1), formando um apoptossomo que, por sua vez, ativa a caspase-9. Mais

tarde, caspase-9 ativa caspase-3, um dos executores finais do processo apoptótico. Recentemente, Chung e Ng (2006) reportaram um aumento significativo dos níveis de Apaf-1 e segmentação de caspase-9 no músculo gastrocnêmio de ratos idosos em conjunto com a elevação da fragmentação do DNA. Por outro lado, citocromo *c* e pro-caspase-9, dois outros componentes do apoptossomo, não mostraram-se alterados nesses mesmos animais. Estes achados estão parcialmente de acordo com um prévio estudo, no qual foi reportada uma elevação no índice de Apaf-1 em músculo gastrocnêmio de ratos idosos (DIRKS; LEEWENBURGH, 2004). Inversamente, esses autores observaram que os níveis tanto de pro-caspase-9 como de caspase-9 não foram aumentados nos animais idosos, enquanto que os níveis citosólicos de citocromo *c* foram até mesmo menores nos animais idosos quando comparados aos animais jovens. Em contraste com essas informações, Siu et al. (2005a), reportaram recentemente aumento nos índices de mRNA e atividade proteolítica de caspase-9, concomitante com o aumento nos níveis de citocromo *c* e Apaf-1, no músculo gastrocnêmio de ratos idosos. A ausência de uma visão unidirecional a respeito destes mediadores pode ser resultado das respostas adaptativas relacionadas ao envelhecimento, envolvendo vários mediadores inibitórios da apoptose, tais como Repressor de Apoptose com domínio de recrutamento de Caspase (ARC), membros da família da Bcl-2 e proteínas de choque térmico (HSPs), os quais são conhecidos por regular a liberação de proteínas mitocondriais pró-apoptóticas (DANIAL; KORSMEYER, 2004). Estudos têm mostrado que ARC, além dos seus efeitos inibitórios sobre a atividade de caspase-2 e -8, é também capaz de prevenir liberação de citocromo *c* a partir da mitocôndria (EKHTERAE et al., 1999). No estudo acima mencionado, relatou-se um aumento da translocação mitocondrial de ARC para o compartimento mitocondrial em animais idosos e isso pode contribuir para a redução da liberação de citocromo *c* mitocondrial observada. A família da proteína Bcl-2 desempenha um papel-chave na regulação da liberação de mediadores apoptóticos pela mitocôndria, com Bcl-2 e Bcl-X_L sendo anti-apoptóticos, enquanto Bax, Bak e Bik promovem apoptose (BEERE, 2004; DANIAL; KORSMEYER, 2004). O equilíbrio entre esses mediadores (i.e., a razão Bax/Bcl-2) é considerado fundamental para o destino da célula, ou seja, se a mesma sobreviverá ou será induzida à morte, resultados estes extremamente dependentes da regulação da estabilidade da membrana mitocondrial. As HSPs pertencem à uma família de chaperones moleculares (proteínas que auxiliam outras a ajustarem-se dentro de sua estrutura tridimensional), conservadas evolutivamente, que são sobre-reguladas em

Motriz, Rio Claro, v.13, n.2, p.137-144, abr./jun. 2007

situações de exposições seguidas a ambientes estressantes, tais como choque térmico e *stress* oxidativo. As HSPs auxiliam na proteção das células contra o *stress* agudo ou crônico pela estabilização e redobramento das proteínas intermediárias ou facilitando a degradação de proteínas que sofreram danos irreversíveis. Além disso, as HSPs têm sido relacionadas com a prevenção da indução de apoptose através de sua interação com vários mediadores apoptóticos, incluindo Bax, Bak, citocromo *c* e caspase-3 (BEERE, 2004). Muitos grupos de pesquisa têm reportado alterações, relacionadas à idade, na expressão de proteínas membros da família Bcl-2 bem como na expressão de várias isoformas de HSPs. Por exemplo, Chung e Ng (2006) encontraram um aumento significativo nos níveis de HSP27, HSP60 e HSP70 em músculo gastrocnêmio de ratos idosos, o que podem representar um mecanismo compensatório em resposta ao ambiente celular pró-apoptótico. Esses investigadores também observaram aumento significativo na expressão de Bax e diminuição na expressão de Bcl-2 no músculo gastrocnêmio de ratos idosos, ao passo que alterações na expressão de Bak não foram observadas. Por outro lado, recentemente, Siu et al. (2005a) reportaram um aumento tanto na expressão de Bax como na de Bcl-2 em músculo gastrocnêmio de ratos idosos se comparados a animais mais jovens. No mesmo contexto, Song et al. (2006) observaram um aumento significativo nos níveis de Bax nos músculos gastrocnêmio e sóleo de ratos idosos e sedentários, com concomitante redução da expressão de Bcl-2 no músculo sóleo dos mesmos animais. Em ambos os músculos, esses autores reportaram aumento significativo da razão Bax/Bcl-2 com a idade e isso foi associado com a elevação dos níveis de caspase-3 e da fragmentação do DNA.

Interessantemente, no mesmo estudo, 12 semanas de treinamento físico, em esteira rolante, foi associado à atenuação substancial da expressão de Bax tanto no músculo gastrocnêmio como no músculo sóleo dos animais senis e um aumento na expressão de Bcl-2 nos mesmos músculos, e essas mudanças foram acompanhadas pela redução na fragmentação do DNA. Esses resultados são consistentes com um prévio estudo desenvolvido por Siu et al. (2004), no qual ratos jovens foram treinados por um período de 8 semanas (5dias/semana) também em esteira rolante. Em particular, o índice de mRNA/Bax foi reduzido e o índice da proteína Bcl-2 elevou-se no músculo sóleo de animais exercitados quando comparados a animais pertencentes ao grupo sedentário. Para além disso, nesse último estudo, o exercício físico foi também capaz de aumentar as expressões do repressor de apoptose ARC e da proteína inibidora de apoptose *X-linked* (XIAP) dos miócitos desses animais, os quais têm a capacidade de se

139

ligarem à caspase-3 e, assim, inibir a atividade proteolítica. O mesmo grupo de pesquisa confirmou, recentemente, uma elevação do nível de XIAP no músculo *patagialis* de codornas idosas submetidas a 14 dias de alongamento induzido por sobrecarga (SIU et al., 2005b). Em outro estudo, Siu et al. (2005a) reportou diminuição da expressão de Bax em músculos lentos de codornas jovens e um aumento nos níveis de Bcl-2, em pássaros jovens e idosos, após 21 dias de alongamento induzido por carga, com concomitante aumento na expressão de HSP27 e HSP22 somente no grupo jovem. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que o exercício físico, praticado por idosos, é capaz de contra-atacar a perda muscular através da atenuação do potencial apoptótico, assim potencialmente atrasando o início e/ou atenuando a progressão da sarcopenia, embora resposta anti-apoptótica parcial ou atrasada tenha sido reportada em animais idosos (SIU; ALWAY, 2005; SIU et al., 2005b; SIU; ALWAY, 2006).

A despeito do seu papel crítico na via de apoptose caspase-independente, a mitocôndria está também envolvida na via de apoptose caspase-dependente. Endonuclease G (EndoG) e fator de indução da apoptose (AIF) são dois mediadores mitocondriais que, a partir de suas translocações para o núcleo, têm a capacidade de produzir fragmentação de DNA em grande escala, independentemente das caspases. Essa via apoptótica pode ser particularmente relevante para a atrofia relacionada com o envelhecimento, uma vez que permite a eliminação do núcleo supérfluo sem a destruição total da fibra muscular pelas caspases. Em um recente estudo, Dirks e Leeuwenburgh (2004) observaram aumento excessivo nos níveis totais de AIF no músculo plantar de ratos idosos devidamente alimentados quando comparados tanto com animais jovens como com animais idosos submetidos à restrição calórica. Em contrapartida, outro estudo (CHUNG; NG, 2006), detectou aumento no nível de AIF no músculo gastrocnêmio de ratos idosos se comparados com animais jovens. Interessantemente, Siu e Alway (2006) reportaram uma redução significativa do nível de AIF em músculo *patagialis*, tanto em codornas idosas como em codornas jovens, após 7 dias de sujeição à carga, mais uma vez evidenciando o efeito anti-apoptótico do exercício físico. Finalmente, uma elevação considerável dos níveis de AIF e fragmentação do DNA no músculo gastrocnêmio de roedores após retirada da carga foram reportadas (SIU et al., 2005a). Com respeito a EndoG, um recente estudo mostrou aumento significativo de seus níveis, com subsequente elevação de morte nuclear por apoptose, em músculo sóleo de ratos submetidos à atrofia crônica através do método de suspensão

dos membros traseiros, comparando animais jovens com animais idosos (LEEUEWENBURGH et al., 2005). Entretanto, torna-se necessário elucidar se essa mesma via de apoptose é específica para a atrofia muscular aguda ou se desempenha também um importante papel na perda muscular relacionada com o envelhecimento.

Evidências recentes sugerem que o retículo endoplasmático (RE) pode apresentar-se como outra organela crítica para a indução e regulação da apoptose. Sob condições de *stress*, tais como a perda de homeostase para o cálcio, devido possivelmente a um dano oxidante à $Ca^{2+}/ATPase$, relacionado a idade, o RE pode induzir a liberação de citocromo *c* a partir da mitocôndria, com isso, iniciando a apoptose (CHEN et al., 2002). Além disso, o RE pode liberar pro-caspase-12, a qual, uma vez ativada pela calpaína-m, segmenta e ativa a caspase-3 (BRECKENRIDGE et al., 2003). Alguns autores têm recentemente reportado um aumento na expressão de pro-caspase-12 e aumento da apoptose no músculo esquelético de ratos idosos, indicando que o RE pode estar envolvido na perda muscular associada ao envelhecimento (DIRKS; LEEUEWENBURGH, 2004; CHUNG; NG, 2006). Surpreendentemente, nenhum desses estudos citados acima foram capazes de detectar alterações nos níveis de caspase-12 (ativa) segmentada. No entanto, ainda permanece obscura a afirmação de que a caspase-12 exibe a verdadeira atividade proteolítica, a qual está em contraste com muitas outras caspases.

Como mencionado anteriormente, a inflamação crônica tem sido considerada um fator contribuinte para a perda muscular relacionada à idade e com os prejuízos funcionais. Certamente, níveis elevados de marcadores tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 e proteína reativa-c, têm sido associados com força diminuída dos músculos e pouca massa muscular, performance física deficiente e inabilidade física relacionada com incidentes em sujeitos idosos (FERRUCCI et al., 1999; CESARI et al., 2004; PENNINX et al., 2004). Interessantemente, Phillips e Leeuwenburgh (2005) mostraram que TNF- α pode ser responsável pela perda muscular em ratos idosos através do aumento de miócitos acometidos pela apoptose. Certamente, uma vez ligado ao receptor de membrana, o TNF- α é capaz de ativar caspase-8, a qual subsequentemente ativa caspase-3, assim iniciando a cascata de apoptose. Além disso, nessa mesma investigação, os autores encontraram que a restrição calórica (RC), uma intervenção anti-envelhecimento extensamente conhecida, foi capaz de contra-atacar a apoptose muscular.

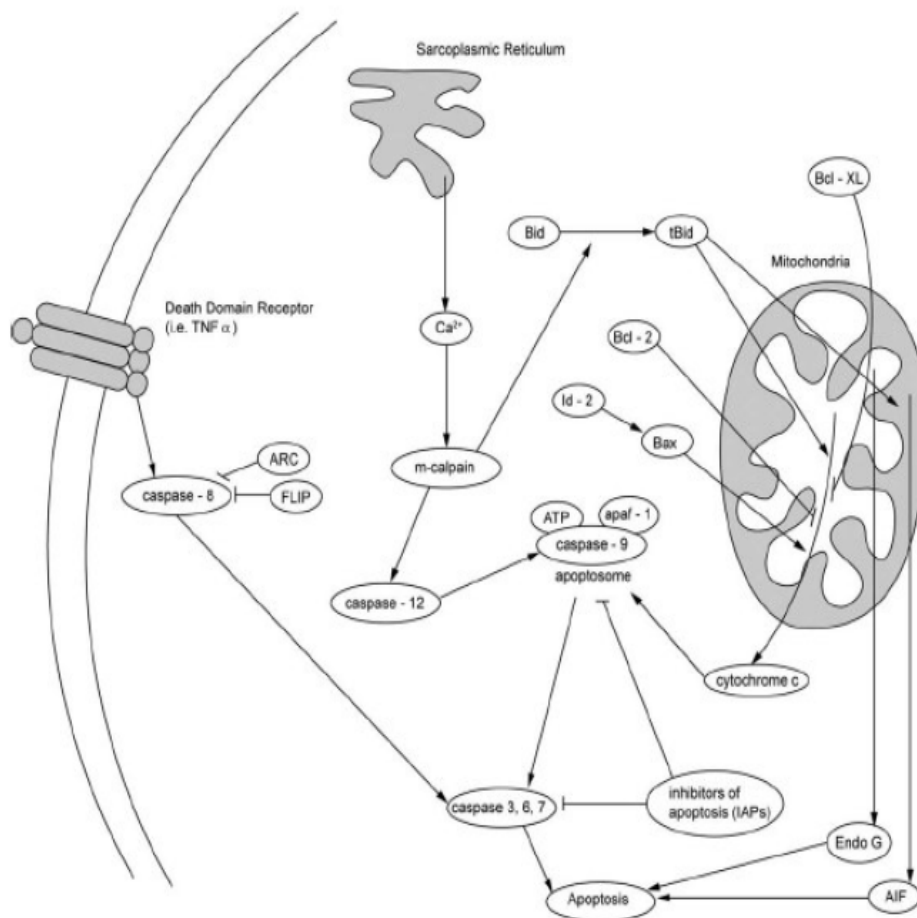


Figura 1: Vias envolvidas na apoptose do músculo esquelético. Receptor e vias mediadas pela mitocôndria e retículo sarcoplasmático podem desempenhar papel importante na indução da apoptose do músculo esquelético durante atrofia induzida pelo desuso e sarcopenia. A ativação de caspase-3 e subsequente apoptose ocorre através da liberação de citocromo *c* a partir da mitocôndria em resposta às alterações na distribuição das proteínas pertencentes a família Bcl-2. Também, disfunção do retículo sarcoplasmático ativa caspase-9 e subsequentemente caspase-3, através da ativação de caspase-12, mediada pela calpaína-m. Elevação de TNF- α com a idade estimula a via mediada pelo receptor, ativando caspase-3 através da ativação de caspase-8. Além disso, as vias caspase-independentes, tais como a liberação de AIF e EndoG a partir da mitocôndria podem desempenhar um importante papel na apoptose induzida pelo desuso em músculos de animais idosos. Inibidores da apoptose (IAPs) podem, no músculo esquelético, proteger as fibras de uma morte prematura ou perda nuclear (retirado de Dupont-Versteegden, 2005).

Evidência em seres humanos

Embora pesquisas utilizando-se de modelos animais sugerem um papel-chave da apoptose na perda muscular relacionada ao envelhecimento, evidências em seres humanos ainda permanecem escassas. Até o presente momento, apenas três trabalhos sobre a apoptose do músculo esquelético induzida pela idade em humanos foram efetuados, mas nenhum deles investigou as vias bioquímicas específicas nem

tampouco as implicações funcionais das mesmas (STRASSER et al., 1999; MALMGREN et al., 2001; WHITMAN et al., 2005). Whitman et al. (2005) encontraram um aumento significativo de mionúcleos apoptóticos no músculo vasto lateral de sujeitos idosos quando comparados com sujeitos jovens. Notou-se, nesse mesmo estudo, que os níveis de caspase-3 e -7 não foram aumentados com a idade, possivelmente indicando o envolvimento da via de apoptose caspase-independente. Apesar de algumas limitações (número

pequeno de participantes, falta de avaliações funcionais e não investigação de vias alternativas de apoptose), este estudo é o único que até agora investigou a apoptose do músculo esquelético, relacionada com o envelhecimento, em sujeitos humanos.

Conclusões e perspectivas futuras

A sarcopenia do envelhecimento é associada a considerável inabilidade física e à mortalidade, e representa elevado fator de risco para a fragilidade muscular. Apoptose acelerada da fibra pode representar um mecanismo-chave que possivelmente regula a sarcopenia. Além disso, evidência pré-clínica indica o papel da apoptose na atrofia muscular subsequente ao desuso crônico, um modelo que assemelha-se a perda muscular observada durante prolongados períodos de repouso na cama. RC e exercício físico têm-se mostrado eficientes no sentido de contra-atacar a apoptose do músculo esquelético em animais idosos, assim atrasando e/ou revertendo a sarcopenia. Finalmente, evidência preliminar parece suportar o papel da apoptose na fisiopatologia da perda muscular em sujeitos humanos idosos. Estudos futuros necessitam investigar com maior profundidade o envolvimento da apoptose do músculo esquelético e vias específicas de sinalização da morte celular programada na progressão da sarcopenia em populações geriátricas. Isso poderia permitir a identificação de marcadores específicos com o intuito de avaliar a efetividade das estratégias de intervenção (i.e., inibidores de caspase, treinamento de força, terapia de reposição hormonal, terapia gênica), designadas para contra-atacar a prevalência de inabilidade física em populações idosas.

Referências

- ALISON, M. R.; SARRAF, C. E. Apoptosis: a gene-directed programme of cell death. *Journal of Royal College of Physicians of London*, London, v.26, p.25–35, 1992.
- BAUMGARTNER, R. N.; KOEHLER, K. M.; GALLAGHER, D.; ROMERO, L.; HEYMSFIELD, S. B.; ROSS, R. R.; GARRY, P. J.; LINDEMAN, R. D. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *American Journal of Epidemiology*, Baltimore, v.147, n.8, p.755–763, 1998. Disponível em: <http://aje.oxfordjournals.org/cgi/reprint/147/8/755>. Acesso em: 20 mar. 2006.
- BEERE, H. M. The stress of dying: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science*, London, v.117, p.2641–2651, 2004. doi: [10.1242/jcs.01284](https://doi.org/10.1242/jcs.01284)
- BRECKENRIDGE, D. G.; GERMAIN, M.; MATHAI, J. P.; NGUYEN, M.; SHORE, G. C. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, Basingstoke, v.22, p.8608–8618, 2003. doi: [10.1038/sj.onc.1207108](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207108)
- CESARI, M.; PENNINX, B. W.; PAHOR, M.; LAURETANI, F.; CORSI, A. M.; RHYS WILLIAMS, G.; GURALNIK, J. M.; FERRUCCI, L. Inflammatory markers and physical performance in older persons: the InCHIANTI study. *Journal of Gerontology. Series A. Biology Science and Medicine Science*, Washington, v.59, p.242–248, 2004.
- CHEN, M.; WON, D. J.; KRAJEWSKI, S.; GOTTLIEB, R. A. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v.277, p.29181–29186, 2002. doi: [10.1074/jbc.M204951200](https://doi.org/10.1074/jbc.M204951200)
- CHUNG, L., NG, Y.C. Age-related alterations in expression of apoptosis regulatory proteins and heat shock proteins in rat skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Diseases*, Amsterdam, v.1762, n.1, p.103–109, 2006. doi: [10.1016/j.bbadis.2005.08.003](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.08.003)
- DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. *Cell*, Cambridge, v.116, p.205–219, 2004. Disponível em: <http://www.cell.com/content/article/abstract/S0092867404000467>. Acesso em: 20 nov. 2006.
- DIRKS, A.; LEEUWENBURGH, C. Apoptosis in skeletal muscle with aging. *American Journal of Physiology. Regulatory and Integrative Comparative Physiology*, Bethesda, v.282, n.2, p.R519–R527, 2002. doi: [10.1152/ajpregu.00458.2001](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00458.2001)
- DIRKS, A.J., LEEUWENBURGH, C. Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v.36, p.27–39, 2004. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2003.10.003](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.10.003)
- DREYER, H. C.; VOLPI, E. Role of protein and amino acids in the pathophysiology and treatment of sarcopenia. *Journal of American College of Nutrition*, New York, v.24, n.2, p.140S–145S, 2005. Disponível em: <http://www.jacn.org/cgi/content/abstract/24/2/140S>. Acesso em: 20 nov. 2006.
- DUPONT-VERSTEEGDEN, E. E. Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia. *Experimental Gerontology*, Oxford, v.40, p.473–481, 2005. doi: [10.1016/j.exger.2005.04.003](https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.04.003)
- EKHTERAE, D.; LIN, Z.; LUNDBERG, M. S.; CROW, M. T.; BROSIUS 3RD, F. C.; NUNEZ, G. ARC inhibits cytochrome c release from mitochondria and protects against hypoxia-induced apoptosis in heart-derived H9c2 cells.

Circulation Research, Baltimore, v.85, n.12, p.e70–e77, 1999.

FERRUCCI, L.; HARRIS, T. B.; GURALNIK, J. M.; TRACY, R. P.; CORTI, M. C.; COHEN, H. J.; PENNINX, B.; PAHOR, M.; WALLACE, R.; HAVLIK, R. J. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons.

Journal of American Geriatrics Society, New York, v.47, p.639–646, 1999.

FRIED, L. P., GURALNIK, J. M. Disability in older adults: evidence regarding significance, etiology, and risk. **Journal of the American Geriatrics Society**, New York, v.45, p.92–100, 1997.

HUGHES, V. A.; FRONTERA, W. R.; ROUBENOFF, R.; EVANS, W. J.; SINGH, M. A. Longitudinal changes in body composition in older men and women: role of body weight change and physical activity. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.76, n.2, p.473–481, 2002. Disponível em: <http://www.ajcn.org/cgi/content/abstract/76/2/473>. Acesso em: 20 nov. 2006.

JANSSEN, I.; SHEPARD, D. S.; KATZMARZYK, P. T.; ROUBENOFF, R. The healthcare costs of sarcopenia in the United States. **Journal of American Geriatrics Society**, New York, v.52, p.80–85, 2004.

KUJOTH, G. C.; HIONA, A.; PUGH, T. D.; SOMEYA, S.; PANZER, K.; WOHLGEMUTH, S.; HOFER, T.; HACKER, T. A.; SEO, A. Y.; SULLIVAN, R.; JOBLING, W. A.; MORROW, J.; VAN REMMEN, H.; SEDIVY, J. M.; YAMASOBA, T.; TANOKURA, M.; SAUPE, K. W.; WEINDRUCH, R.; LEEUWENBURGH, C.; PROLLA, T. A. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress and apoptosis in mammalian aging. **Science**, New York, v.309, n.5733, p.481–484, 2005. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/309/5733/481>. Acesso em: 20 nov. 2006. doi:10.1126/science.1112125.

LARSSON, L.; SJODIN, B.; KARLSSON, J. Histochemical and biochemical changes in human skeletal muscle with age in sedentary males, age 22–65 years. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v.103, p.31–39, 1978.

LEEUWENBURGH, C.; GURLEY, C. M.; STROTMAN, B. A.; DUPONT-VERSTEEGDEN, E. E. Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. **American Journal of Physiology. Regulatory and Integrative Comparative Physiology**, Bethesda, v.288, n.5, p.R1288–R1296, 2005.

MALMGREN, L. T.; JONES, C. E.; BOOKMAN, L. M. Muscle fiber and satellite cell apoptosis in the aging human thyroarytenoid muscle: a stereological study with confocal laser scanning microscopy. **Otolaryngological and Head and Neck Surgery**, Rochester, v.125, n.1, p.34–39, 2001. doi:10.1067/mhn.2001.116449.

METTER, E. J.; TALBOT, L. A.; SCHRAGER, M.; CONWIT, R. Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men. **Journal of Gerontology. Series A. Biology Science and Medicine Science**, Washington, v.57, p.B359–B365, 2002.

PENNINX, B. W.; ABBAS, H.; AMBROSIUS, W.; NICKLAS, B. J.; DAVIS, C.; MESSIER, S. P.; PAHOR, M. Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. **The Journal of Rheumatology**, Toronto, v.31, p.2027–2031, 2004.

PHILLIPS, T.; LEEUWENBURGH, C. Muscle fiber specific apoptosis and TNF- α signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 19, p. 668–670, 2005. doi: 10.1096/fj.04-2870fje

POLLACK, M.; PHANEUF, S.; DIRKS, A.; LEEUWENBURGH, C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. **Annals of the New York Academy of Science**, v.959, p.93–107, 2002. Disponível em: <http://www.annalsnyas.org/cgi/content/abstract/959/1/93>. Acesso em: 20 nov. 2006.

RANTANEN, T.; GURALNIK, J. M.; FOLEY, D.; MASAKI, K.; LEVEILLE, S.; CURB, J. D.; WHITE, L. Midlife hand grip strength as a predictor of old age disability. **JAMA. The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.281, n.6, p.558–560, 1999. Disponível em: <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/281/6/558>. Acesso em: 20 nov. 2006.

ROUBENOFF, R. Sarcopenia and its implications for the elderly. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 54, supplement 3, p. S40–S47, 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/ejcn/journal/v54/n3s/abs/1601024a.html>. Acesso em: 20 nov. 2006.

SIU, P. M.; ALWAY, S. E. Age-related apoptotic responses to stretch-induced hypertrophy in quail slow-tonic skeletal muscle. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v.289, p.C1105–C1113, 2005. Disponível em: <http://ajpcell.physiology.org/cgi/content/abstract/289/5/C1105>. Acesso em: 20 nov. 2006. doi:10.1152/ajpcell.00154.2005

SIU, P. M.; ALWAY, S. E. Aging alters the reduction of pro-apoptotic signaling in response to loading-induced hypertrophy. **Experimental Gerontology**, Oxford, v.41, p.175–188, 2006. doi:10.1016/j.exger.2005.11.004

SIU, P. M.; BRYNER, R. W.; MARTYN, J. K.; ALWAY, S. E. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. **FASEB Journal**, Bethesda, v.18, n.10, p.1150–1152, 2004. Disponível em: <http://www.fasebi.org/cgi/content/short/03-1291fjev1>. Acesso em: 20 nov. 2006. doi:10.1096/fj.03-1291fje

SIU, P. M.; PISTILLI, E. E.; ALWAY, S. E. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. **American Journal of Physiology and Regulation of Integrated Comparative Physiology**, v.289, p.R1015–R1026, 2005a.

SIU, P. M.; PISTILLI, E. E.; RYAN, M. J.; ALWAY, S. E. Aging sustains the hypertrophy-associated elevation of apoptotic suppressor X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in skeletal muscle during unloading. **Journal of Gerontology. Series A. Biology Science and Medicine Science**, Washington, v.60, n.8, p.976–983, 2005b.

Disponível em:

<http://biomed.gerontologyjournals.org/cgi/content/abstract/60/8/976>. Acesso em: 20 nov. 2006.

SONG, W.; KWAK, H. B.; LAWLER, J. M. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. **Antioxidants Redox Signaling**, Larchmont, v.8, p.517–528, 2006. Disponível em:

<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2006.8.517>. Acesso em: 20 nov. 2006. doi:10.1089/ars.2006.8.517

STRASSER, H.; TIEFENTHALER, M.; STEINLECHNER, M.; BARTSCH, G.; KONWALINKA, G. Urinary incontinence in the elderly and age-dependent apoptosis of rhabdosphincter cells. **Lancet**, London, v.354, n.9182, p.918–919, 1999. doi:10.1016/S0140-6736(99)02588-X

SZULC, P.; DUBOEU, F.; MARCHAND, F.; DELMAS, P. D. Hormonal and lifestyle determinants of appendicular skeletal muscle mass in men: the MINOS study. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.80, n.2, p.496–503, 2004. Disponível em:

<http://www.ajcn.org/cgi/content/abstract/80/2/496>. Acesso em: 20 nov. 2006.

VANDERVOORT, A. A. Aging of the human neuromuscular system. **Muscle Nerve**, New York, v.25, n.1, p.17–25, 2002. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/89011094/ABSTRACT>. Acesso em: 20 nov. 2006. doi: 10.1002/mus.1215

VISSER, M.; PAHOR, M.; TAAFFE, D. R.; GOODPASTER, B. H.; SIMONSICK, E. M.; NEWMAN, A. B.; NEVITT, M.; HARRIS, T. B. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. **Journal of Gerontology. Series A. Biology Science and Medicine Science**, Washington, v.57, n.5, p.M326–M332, 2002.

Disponível em:

<http://biomed.gerontologyjournals.org/cgi/content/abstract/57/5/M326>. Acesso em: 20 nov. 2006.

WHITMAN, S. A.; WACKER, M. J.; RICHMOND, S. R.; GODARD, M. P. Contributions of the ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with

age. **Pflugers Archiv. European Journal of Physiology**, Berlin, v.450, p.437–446, 2005.

Agradecimento

Os autores fazem um agradecimento especial à *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo apoio financeiro ao presente trabalho (Processo número: PDEE/388706-5).

Endereço para Correspondência:

Professor Mestre Fabrício Azevedo Voltarelli

Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física IB Unesp Rio Claro SP

Avenida 24-A, 1515 – Bela Vista

Rio Claro SP

13.506-900 – Fax: (019) 3526-4100 - Fone: (019) 3526-4321

E-mail: faunesp8@yahoo.com.br

Recebido em: 21 de maio de 2007.

Aceito em: 12 de julho de 2007.