LILIANA RIBEIRO

**Avaliação morfoquantitativa do miocárdio de ratos Wistar submetidos à
subnutrição proteica e à dieta padrão de Moçambique nos períodos pré e
pós-natal**

São Paulo

2015

LILIANA RIBEIRO

**Avaliação morfoquantitativa do miocárdio de ratos Wistar submetidos à subnutrição
proteica e à dieta padrão de Moçambique nos períodos pré e pós-natal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Matsuyoshi Mori

De acordo:

Orientador

São Paulo
2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3247
FMVZ

Ribeiro, Liliana

Avaliação morfoquantitativa do miocárdio de ratos Wistar submetidos à subnutrição proteica e à dieta padrão de Moçambique nos períodos pré e pós-natal / Liliana Ribeiro. -- 2015.
88 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Matsuyoshi Mori.

1. Subnutrição. 2. Dieta de Moçambique. 3. Coração. 4. Ventrículo esquerdo. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação morfoquantitativa do miocárdio de ratos Wistar submetidos à subnutrição proteica e à dieta padrão de Moçambique nos períodos pré e pós-natal", protocolado sob o nº 3094/2013, utilizando 30 (trinta) ratos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti (ICB), foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Evaluation of myocardial morphoquantitative Wistar rats malnutrition protein diet and standard of Mozambique periods in pre and post-natal", protocol number 3094/2013, utilizing 30 (thirty) rats, under the responsibility Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti (ICB), was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	---

Decl. CEUA.013/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 020/12/CEUA, aprovado em 26.03.12, e por solicitação do Prof. Dr. **Edson Aparecido Liberti**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão de *Ligia Pelosi Mendonça, Lídia dos Santos Rocha Cruz e Liliana Ribeiro* ao Projeto de Pesquisa "*Análise morfoquantitativa e ultraestrutural dos componentes do plexo mioentérico do intestino delgado de ratos submetidos à dieta padrão de moçambique nos períodos pré e pós-natal*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 05 de março de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RIBEIRO, Liliana

Título: Avaliação morfoquantitativa do miocárdio de ratos Wistar submetidos à subnutrição proteica e à dieta padrão de Moçambique nos períodos pré e pós-natal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Dedicatória

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela essência a mim oferecida e pelas pessoas colocadas em meu caminho... Muito Obrigada, Muito Obrigada, Muito Obrigada!!!

Minha avó e madrinha **Iracema** com seus **97 anos**, sempre me ensinando algo novo, pois a vida nos oferece situações para entendermos nosso verdadeiro valor nesta **Vida**.

José Luiz e Ana, meus pais, muito obrigada pela oportunidade que Deus deu de ser sua Filha.

Rafael e Letícia, filhos maravilhosos, preciosidades que o Senhor concedeu para fazer parte da minha existência. Agradeço todos os dias pelo presente de tê-los ao meu lado e pela oportunidade de conhecer o verdadeiro significado de uma FAMÍLIA, muito obrigada pelo amor, carinho e apoio em minhas escolhas. Eternamente os amarei!!!

Wagner e Família, deram-me a alegria de ser tia da linda **Ana Julia**. Te Amo muito minha linda!!

Sergio... o seu apoio na realização desta oportunidade única, o mestrado, foi fundamental, pelas palavras ditas e não ditas, compreendendo minha ausência neste período, onde mesmo distantes mais próximos ficamos. Muito obrigada!!!

As minhas queridas vizinhas da Alencar Araripe, **D. Jacira Arantes**, a sabedoria da idade, **Juçara Maria Arantes**, foi minha mãe, irmã, amiga, companheira em muitas situações, tudo com um toque da hospitalidade mineira, e **Catalina**, com seu companheirismo, ficaram melhores meus dias em São Paulo. Muito obrigada a todas!!!!

Rafael Packer, amigo do meu filho, meu amigo também, muito obrigada pela acolhida e confiança.

Aos **Amigos e Amigas** espalhados por este Brasil, que acreditam em mim, e compreenderam minha ausência nesta fase da minha vida em São Paulo.

Prof. Dr. EDSON APARECIDO LIBERTI, meu respeito pela sua perseverança em seguir seu caminho com dignidade, apenas de TUDO. Agradeço por permitir-me vivenciar esta grande experiência com o laboratório e à **ANATOMIA**. Seus exemplos como pessoa e profissional estão gravados em minha memória. Muito obrigada pela oportunidade!!!

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, por proporcionar-me um desenvolvimento científico, profissional e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**, pelo auxílio concedido em forma de bolsa de estudos.

À **Profª Dª Maria Angélica Miglino**, acolhendo-me como aluna do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior** onde desempenha o importante papel de Coordenador do Programa de Pós-Graduação, e como professor sou muito grata pela sua forma de ensino, levando-me ao verdadeiro aprendizado.

Ao **Prof. Dr. Matsuyoshi Mori**, sempre muito atencioso, compreensivo em todos os momentos que necessitei da sua atenção, tudo com muita presteza. Muito obrigada por esse exemplo de pessoa!!

À **Profª Drª Catarina Tivane Nhamposse**, onde tive a oportunidade de conhece-la, apesar do pouco tempo de convívio, mas o necessário para entender a importância de nossas pesquisas para Moçambique. Fiquei honradíssima com sua presença como membro internacional da minha banca. Muito obrigada pela contribuição.

Ao **ICB III - USP** pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas para o aprimoramento do meu aprendizado profissional e pessoal. Os funcionários do Biotério: **Fábio França e Renivaldo de Souza**, companheirismo e seriedade em todos os momentos que foram necessários para com os experimentos realizados.

À mestre **Profª Drª Silvia Lacchini**, muito obrigada pelo incentivo quanto a Anatomia durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE, e neste período, consegui sentir o quanto a admiro como profissional e pessoa. E a **Profª Drª Flávia de Oliveira**, sempre muito atenciosa e queridas por todos no nosso laboratório.

VQM, um laboratório que em Janeiro de 2012 através da IV Jornada de Anatomia no ICB III – USP me fez deparar com pessoas que fizeram toda a diferença em minha **Vida, Josemberg Baptista e Ricardo Eustáquio**, pessoas acolhedoras, gentis, educadas, determinadas e companheiras. Muito Obrigada pelo incentivo!

E logo passei a conhecer melhor o **LAFACC** (Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia), onde tive a oportunidade do aprendizado das técnicas laboratoriais e convívio com colegas especiais: meu braço direito, **Any Kelly** – nas práticas laboratoriais, companheirismo, amizade e dedicação. No meu dia-dia sempre me ensinado a compreender melhor Tudo, todas as passagens por este caminhar pela USP, por São Paulo, pela VIDA. “Amigo é coisa pra se guardar debaixo de sete chaves, dentro do coração.” Serei eternamente grata; **Flávio Tampelini** – Amigo, companheiro para todas as horas... muito obrigada pela oportunidade de convívio com uma pessoa tão especial e iluminada. Lembranças inesquecíveis ficarão para sempre, você foi essencial; **Cristina Bolina** – momentos de muito trabalho e amizade intensa, meu muito obrigada por TUDO!!!; **Paulo**

Henrique Matos, Regina Bolina e Samuel – pouco tempo de contato, mas o necessário para firmar uma amizade. Parabéns pela família linda que vocês constituíram!!; **Valquíria Barboza Mariotti** – uma amizade com quem compartilho uma nova experiência de VIDA, que Deus te abençoe nesta sua jornada.

Agradeço também pela colaboração em várias situações onde estar próximo no momento oportuno fez toda a diferença: **Aline Marosti, Josy Cal, Giovanna Campos, Lúcia Mendonça, Lídia Rocha, Ricardo Bandeira, Luciano Cesar, Gabriela Reginato, Marcelo Cavalli e Bruna Caixeta.**

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Anatomia, **Marta Maria Righetti, Sebastião A. Boleta, Sônia Regina Yokomizo e Kelly P. N. Borges**, pela paciência, dedicação e auxílio com as técnicas laboratoriais, sempre com grande disponibilidade e carinho. Muito obrigada por TUDO, lembranças inesquecíveis (um laboratório com pessoas maravilhosas, um micrótomo e a “Antena 1”).

Rosana Duarte Prisco, que pessoa maravilhosa, sensível e guerreira. Nossa amizade surgiu de uma forma simples e espontânea, entendemos nossas qualidades e diferenças. Assim ficou mais fácil e prolongado nossos encontros para a avaliação da estatística. Sua dedicação extrema à Estatística reafirma que, fazer bem feito tudo é a nossa maior satisfação. Namastê!!!

Malu Motta, obrigada pela amizade, verdadeiro companheirismo e dias maravilhosos no seu “Cantinho Encantado”, onde pude desfrutar de muito profissionalismo acompanhado de momentos acolhedores. Muito obrigada **Henrique, Vinícius e Deco**, cada um de alguma forma colaboraram para o meu aprendizado. Parabéns Equipe!!!

Aos funcionários do ICB-USP e da FMVZ-USP, especialmente **Maycon Barbosa, Jaqueline Martins, Rose Eli** e as bibliotecárias **Stela Madruga, Evadne A. Will e Elza Faquim**, pela dedicação e respeito aos alunos, o meu muito obrigada.

Agradeço aos componentes da banca de defesa desta dissertação pela disponibilidade e atenção em participar deste momento. Muito obrigada!

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, tão importante para minha vida profissional, o meu sincero agradecimento.

E finalmente, ao **JÚNIOR**, que, in memoriam, se mantém presente entre nós. Divido esta minha conquista com você meu **IRMÃO...**

“A Vida é bela, só depende do seu ponto de vista...”

Rafael Ribeiro Cardoso

RESUMO

RIBEIRO, L. Avaliação morfoquantitativa do miocárdio de ratos Wistar submetidos à subnutrição proteica e à dieta padrão de Moçambique nos períodos pré e pós-natal. [Morphoquantitative evaluation of Wistar rat myocardium submitted to protein malnutrition and the standard diet of Mozambique in the pre- and postnatal]. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O impacto da desnutrição não se processa da mesma maneira nos diversos órgãos e tecidos do organismo, promovendo alterações na estrutura corpórea geral. O coração não é isento das consequências catabólicas da desnutrição. Em Maputo (capital de Moçambique), comprova um aumento na incidência de desnutrição grave, o que faz com que proporcione uma das maiores taxas de mortalidade, chegando a 20%. O objetivo deste trabalho foi avaliar possíveis repercussões morfofuncionais nos cardiomiócitos constituintes dos ventrículos esquerdos de ratos Wistar. Para tanto, foram utilizadas as dietas hipoprotéica (contendo 5% de caseína, e que caracteriza estado de subnutrição - grupo S); padrão de Moçambique (cujo conteúdo proteico vegetal é extraído do amendoim – grupo M) e protéica (com 20% de caseína, caracterizando o grupo nutrido ou controle - grupo N). Os animais S, M e N constituíram dois grupos de estudo, sendo avaliados aos 21 dias de vida (época do desmame), e aos 42 dias. Após o desmame, foram mensurados os parâmetros metabólicos de ingestão de água e alimentar, bem como os de excreção de fezes e urina. As amostras dos corações foram processadas com técnicas rotineiras de histologia e submetidas a colorações que permitiram evidenciar o colágeno. Os aspectos ultraestruturais do ventrículo esquerdo também foram analisados. Para as avaliações, os dados foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores (idade e dieta) e quando necessário aplicou-se pós-teste de Bonferroni ou Tukey. Os nossos resultados mostram que a subnutrição é capaz de modificar as propriedades biomecânicas do miocárdio, causando atraso no seu desenvolvimento. Quanto às dietas aqui empregadas, mostram que a dieta padrão de Moçambique não atende uma nutrição adequada em comparação ao grupo nutrido, dentro dos parâmetros analisados. Conclui-se que a dieta padrão de Moçambique tem seus efeitos deletérios da subnutrição, nos aspectos metabólicos, estruturais e ultraestruturais do ventrículo esquerdo.

Palavras-chave: Subnutrição. Dieta de Moçambique. Coração. Ventrículo esquerdo.

ABSTRAT

RIBEIRO, L. Morphoquantitative evaluation of Wistar rat myocardium submitted to protein malnutrition and the standard diet of Mozambique in the pre- and postnatal. [Avaliação morfoquantitativa do miocárdio de ratos Wistar submetidos à subnutrição proteica e à dieta padrão de Moçambique nos períodos pré e pós-natal]. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The impact of malnutrition is not processed in the same way in various organs and tissues of the body, promoting changes in the general body structure. The heart is not exempt from the catabolic effects of malnutrition. In Maputo (Mozambique's capital), proves an increased incidence of severe malnutrition, providing one of the highest mortality rates, reaching 20%. The aim of this study was to evaluate possible morphological and functional repercussions of the cardiomyocytes of left ventricles from Wistar rats. Therefore, low protein diets were used (containing 5% casein, malnutrition group - S group); standard diet from Mozambique (the vegetable protein content was extracted from the peanut - group M) and protein diet (with 20% casein - fed/control group - N group). Animals S, M and N constituted two study groups and were evaluated at 21 days of life (time of weaning), and at 42 days. After weaning, the metabolic parameters of ingestion of water and food and the excretion of faeces and urine were measured. The samples of hearts were processed and subjected to histological techniques which emphasize collagen. Ultrastructural aspects of the left ventricle were analyzed. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) with two factors (age and diet) and when required Bonferroni or Tukey post-test were applied. Our results show that malnutrition is capable of modifying the biomechanical properties of the myocardium, causing delay in its development. As for diets employed here, show that the standard diet from Mozambique does not provide adequate nutrition when compared to control group within the parameters analyzed. It concludes that the standard diet from Mozambique has its deleterious effects of malnutrition, metabolic, structural and ultrastructural aspects of the left ventricle.

Keywords: Malnutrition. Diet Mozambique. Heart. Left ventricle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Continente Africano	29
Figura 2 -	Sexagem de ratos Wistar	38
Figura 3 -	Fluxograma do período experimental	39
Figura 4 -	Gaiola metabólica.....	40
Figura 5 -	Gaiola metabólica com animal	40
Figura 6 -	Coração de rato Wistar	41
Figura 7 -	Áreas e espessuras analisadas nos cortes corados pela HE	42
Figura 8 -	Campos obtidos nos cortes corados pela HE	43
Figura 9 -	Espessura de cardiomiócitos	44
Figura 10 -	Comprimento naso-anal dos animais	47
Figura 11 -	Morfologia do corte transversal ventricular dos grupos experimentais	49
Figura 12 -	Núcleos de cardiomiócitos	50
Figura 13 -	Técnica de Picrosírius	51
Figura 14 -	Técnica de Weigert.....	52
Figura 15 -	MET dos cardiomiócitos e os nucléolo dos cardiomiócitos dos grupos de 21 dias	53
Figura 16 -	MET dos cardiomiócitos dos grupos de 42 dias	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das rações, sendo o conteúdo proteico da ração M é extraído do amendoim	37
Tabela 2 - Peso corporal, comprimento naso-anal, peso do coração e razão peso coração por peso corporal dos animais dos grupos N, M e S com 21 e 42 dias	54
Tabela 3 - Avaliações Metabólicas nas semanas S1 e S2 dos animais dos grupos N, M e S.....	57
Tabela 4 - Morfometria do Ventrículo Esquerdo (VE) dos animais dos grupos N, M e S, com 21 e 42 dias	61
Tabela 5 - Densidade de volume de núcleos de cardiomiócitos Vv (%) e espessura dos cardiomiócitos (μm) dos animais dos grupos N, M e S, com 21 e 42 dias	64

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Representação gráfica da média e desvio padrão do Peso Corporal ao Nascer (g) dos animais dos grupos N, M e S, Peso Corporal (g), Comprimento naso-anal (cm), Peso do Coração (g) e Razão Peso do Coração/Peso Corporal (%) dos animais N, M e S em 21 e 42 dias56
- Gráfico 2 - Representação gráfica da média e desvio padrão da Massa Corporal (g), Ingestão Alimentar (g), Razão Ingestão Alimentar/Massa Corporal (%), Ingestão de Água (g), Razão Ingestão de Água/Massa Corporal (%), Excreção de Urina (g), Razão Excreção de Urina/Ingestão de Água (%), Excreção de Fezes (g), Razão Excreção de Fezes/Ingestão Alimentar (%) dos animais dos grupos N, M e S, submetidos às gaiolas metabólicas nas semanas S1 e S2.....59
- Gráfico 3 - Representação gráfica da média e desvio padrão, da AV (mm²), AEVE (mm²), AIVE (mm²), Razão AEVE/AV (%), Razão AIVE/AV (%), Razão AIVE/AEVE (%) e EVE (mm).....63
- Gráfico 4 - Representação gráfica da média e desvio padrão da Vv (%) e Espessura dos cardiomiócitos (μm) dos animais dos grupos N, M e S, com 21 e 42 dias65
- Gráfico 5 - Representação gráfica da distribuição de frequência (%) da espesura dos cardiomiócitos (μm) dos animais dos grupos N, M e S, com 21 e 42 dias.....65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	Parede Anterior 1
A2	Parede Anterior 2
AV	Área Ventricular total
AEVE	Área Externa do Ventrículo Esquerdo
AIVE	Área Interna do Ventrículo Esquerdo
DA	Desnutrição aguda
DC	Desnutrição crônica
DP	Desvio Padrão
EVE	Espessura das paredes do Ventrículo Esquerdo
FAO	Food Alimentation Organization
g	região granular
HE	Hematoxilina-eosina
If	região fibrilar
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros quadrados
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
OMS	Organização Mundial de Saúde
P1	Parede Posterior 1
P2	Parede Posterior 2
PBS	Tampão fosfato de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
P _P	Número de pontos que atinge o núcleo dos cardiomiócitos
P _T	Número de pontos do sistema teste

S	Área Septal
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo
V _v	Densidade de volume de núcleos de cardiomiócitos
V.E.U.	Vida extrauterina
μm	Micrômetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	SUBNUTRIÇÃO E CONSEQUÊNCIAS EM DIVERSOS ORGÃOS E TECIDOS..	24
2.2	SUBNUTRIÇÃO E A DIETA PADRÃO DE MOÇAMBIQUE	27
2.3	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO MIOCÁRDIO	30
2.3.1	Alterações do miocárdio devido à subnutrição.....	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVOS GERAIS	35
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	35
4	MATERIAL E MÉTODO	37
4.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS	37
4.2	AVALIAÇÃO METABÓLICA	40
4.3	HISTOLOGIA.....	41
4.4	MÉTODOS QUANTITATIVOS	42
4.4.1	Determinação da área e da espessura do Ventrículo Esquerdo (VE)	42
4.4.2	Estereologia para a determinação da densidade de volume de núcleos de cardiomiócitos	43
4.4.3	Espessura de cardiomiócitos.....	44
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	44
4.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	45
5	RESULTADOS	47
5.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E COMPORTAMENTAIS GERAIS	47
5.2	ASPECTOS QUALITATIVOS.....	48
5.2.1	Morfologia dos ventrículos	48
5.2.2	Núcleos de cardiomiócitos.....	49
5.2.3	Tipificação das fibras colágenas e das fibras elásticas	50

5.2.4	Ultraestrutura dos cardiomiócitos	52
5.3	ASPECTOS QUANTITATIVOS.....	54
5.3.1	Peso (corporal e do coração) e comprimento dos animais.	54
5.3.2	Análise metabólica.....	57
5.3.3	Análise Morfométrica	61
5.3.4	Análise Estereológica	64
6	DISCUSSÃO	67
6.1	PARÂMETROS FÍSICOS E COMPORTAMENTAIS GERAIS.....	67
6.2	PARÂMETROS METABÓLICOS	68
6.3	ANÁLISE QUALITATIVA.....	69
6.4	ANÁLISE QUANTITATIVA.....	71
7	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	77

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A desnutrição neonatal é um dos problemas básicos de saúde pública que ainda permanece nos países em desenvolvimento, nos quais a privação econômica leva ao atraso do crescimento infantil associado a alterações metabólicas severas (FIORETO et al., 2002). Estudos de Guedes (2004) relatam que as consequências da desnutrição neonatal à longo prazo, estão correlacionadas de forma proporcional à intensidade e à duração das alterações nutricionais, e podem afetar tanto a estrutura quanto o metabolismo de órgãos e sistemas, fenômeno conhecido como programação metabólica (GODFREY, 2001; SRINIVASAN, 2008).

A competência de um órgão ou de um sistema exercer sua função depende da distribuição do fluxo sanguíneo, do fornecimento de oxigênio e do aporte de substâncias nutritivas adequadas. Consequentemente, vários tecidos, órgãos e sistemas ficam comprometidos quando é submetido à carência alimentar (MADI; CAMPOS, 1975).

A desnutrição calórico-proteica está integrada ao déficit funcional da imunidade intercedida por células e da imunidade humoral (CHANDRA, 2002), ao aumento do tempo do ciclo celular das linhagens da medula óssea (GÓMEZ et al., 1996), às modificações na taxa de apoptose (ORTIZ et al., 2009), depleções e disfunções enzimáticas, mitocondriais (NORMAN, 2005) e aumento da sensibilidade à insulina no músculo solear (GRACE et al., 1990).

Nunez et al. (2008), reconheceram diversos fatores que podem aumentar o risco de hipertensão arterial, dentre eles a idade, o histórico familiar de hipertensão, o excesso de peso, as dietas ricas em sal, o sedentarismo, e a desnutrição intrauterina. O estresse é um dos fatores importantes na desnutrição materna, que durante a gravidez pode ter decorrências deletérias para a progênie. Dados históricos apontam para estes efeitos em populações humanas. Por exemplo, durante a Segunda Guerra Mundial, o povo da Holanda e Rússia sujeitou-se a restrições alimentares severas devido à interdição de abastecimento de alimentos pelo exército alemão. As crianças nascidas nessas condições não só eram pequenas para a idade gestacional, mas também desenvolveram problemas de saúde significativos mais tarde na vida. Grandes sequelas têm sido descritas, incluindo os do sistema cardiovascular, a diabetes de tipo II, e transtornos de humor e de personalidade (GHEORGHE et al., 2009).

Para Drott e Lundholm (1992), o coração não é isento das consequências catabólicas da desnutrição, mas está sujeito aos mesmos efeitos depressores do músculo esquelético

quando submetido a tais condições. A restrição alimentar em ratos tem se mostrado útil como modelo para a desnutrição humana, uma vez que estes animais compartilham muitas características da desnutrição em humanos (FRANCO et al., 2002; TOMKINS et al., 2007).

Devido à estreita relação existente entre o coração e a subnutrição, torna-se imprescindível o conhecimento das adaptações realizadas por esse órgão, em situação de debilitação nutricional proteica, já que a mesma promove alterações de âmbito bioquímico influenciando diretamente o seu desempenho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo apresenta-se a revisão da literatura sobre os assuntos envolvidos no estudo, cujos tópicos serão subdivididos.

2.1 SUBNUTRIÇÃO E CONSEQUÊNCIAS EM DIVERSOS ORGÃOS E TECIDOS

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), em 1999, lançou o primeiro relatório titulado 'The state of food insecurity in the world', onde informava a existência de mais de 800 milhões de pessoas desnutridas no mundo. Em 2009, (FAO), estimou que 1,02 bilhões de pessoas estivessem desnutridas no mundo. Isso representa mais pessoas famintas que em qualquer momento, desde 1970. O número vem crescendo de forma sem precedentes na história, a despeito da redução da taxa de natalidade.

Desde 1948, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu a saúde humana como "um estado de bem-estar físico, mental e social completo e não meramente a ausência de doença ou enfermidade". A reflexão sobre essa definição leva-nos a compreender que a responsabilidade pela a saúde humana está bem além do domínio médico, ciência e muitas outras disciplinas (BRUULSEMA, 2012).

A desnutrição é como uma síndrome que abrange uma série de doenças, e se caracteriza pela existência de um desequilíbrio celular entre o fornecimento de nutrientes, de energia e as necessidades que o corpo requer para garantir o crescimento, manutenção e funções específicas incluindo a desnutrição energético-proteica e a deficiência em vitaminas e minerais (JAHOOR et al., 2008).

Em 2006, a FAO determinou a desnutrição como ingestão de alimentos insuficientes e prolongada, associada à baixa absorção dos alimentos consumidos e é aplicada às deficiências calóricas. E o termo subnutrição definiu-se como a quantidade insuficiente de nutrientes do que aquela mínima necessária para manter o peso corporal.

Classicamente, duas síndromes são reconhecidas: marasmo que representa o resultado extremo de baixa ingestão, com a interrupção completa do crescimento e perda grave de músculo e tecido adiposo, e kwashiorkor onde as características são edema generalizado

(retenção hídrica) e muitas vezes um baixo consumo de proteína e vitaminas. A OMS desenvolveu critérios para classificar a subnutrição em moderada e severa em crianças. Para esta divisão são utilizados os indicadores altura por idade (A/I) e peso por altura (P/A) para a classificação do estado nutricional com pontos de corte pré-estabelecidos (EMERY, 2005; MOUTINHO, 2009; ANUMOD, 2014).

Com base em relatórios da OMS, desnutrição tem sido reconhecida como a responsável pela grande quantidade de doenças no mundo. Falta de comida, no entanto, nem sempre é a causa primária para a desnutrição. Em muitos países em desenvolvimento e nações subdesenvolvidas, a diarreia é um fator importante na desnutrição. Outros fatores são a alimentação com mamadeira com más condições sanitárias, conhecimento inadequado da prática de assistência à infância, o analfabetismo do país, fatores econômicos e falta de alimentação adequada (ANUMOD, 2014).

O efeito da ingestão inadequada de uma criança pode retardar ou parar o crescimento, a fim de que a proteína e energia possam ser usadas para a manutenção do tecido existente. Se o déficit de energia é muito grave, o equilíbrio energético não pode ser mantido; com isso, haverá uma perda de tecido do corpo, para proporcionar substratos para a manutenção metabólica das células restantes (EMERY, 2005).

A desnutrição é classificada por dois tipos básicos, sendo, o primeiro tipo o mais importante, é a desnutrição energético-proteica, que se distingue pela baixa ingestão de alimentos ricos em carboidratos e proteínas. Este é o tipo mais letal, sendo mencionada como um problema da fome mundial. O segundo tipo, à deficiência de micronutrientes, como vitaminas e minerais (WORLD HUNGER, 2011).

Perturbações útero intrínsecas ou extrínsecas podem potencializar os efeitos do crescimento e desenvolvimento do feto. Em casos graves, pode induzir à restrição de crescimento intrauterino e déficit de crescimento pós-natal. As mudanças adaptativas do embrião ou feto a um ambiente intrauterino alterado pode melhorar as chances imediatas de sobrevivência, mas é possível ocorrer prejuízos na vida pós-natal (RAMADAN, 2013).

Subnutrição, englobando tanto a desnutrição e sobrepeso, é um problema para praticamente todos os países do mundo. As decorrências da desnutrição têm implicações fundamentais em todo o ciclo de vida, como: chances reduzidas de sobrevivência, aumento do risco de doença aguda e crônica, prejuízo no aprendizado na escola e menor produtividade econômica dos indivíduos e das sociedades. As consequências são transmitidas através das gerações através de ligações de nutrição materno-infantil. (BLACK et al., 2013; HADDAD L et al., 2015).

A subnutrição materna contribui para a restrição do crescimento fetal, o que aumenta o risco de mortes neonatais e para os sobreviventes desnutridos que vivem por dois anos de idade com deficiências de vitaminas essenciais e minerais. Em ratos, a deficiência nutricional materna no período crítico de crescimento e desenvolvimento da prole é capaz de interferir na função dos sistemas orgânicos em decorrência de alterações no padrão de eventos celulares, que levam a consequências deletérias tanto na aquisição de padrões fisiológicos maduros do organismo (BORBA et al., 2000) quanto na ocorrência de reações metabólicas necessárias à manutenção da homeostase fisiológica.

De acordo com Morley e Lucas (1993) relata a consequência da desnutrição em diversos sistemas. Segundo eles, a desnutrição é capaz de causar várias deficiências que se refletem ao longo da vida, tais como a redução de força muscular e a fadiga precoce, deterioração da função muscular respiratória, cardíaca, sexual e imunológica, além de predispor ao estado de depressão, irritabilidade, ansiedade, incapacidade de manter a concentração e redução do desejo sexual. Em crianças, a desnutrição prejudica ainda o crescimento e provoca atraso na maturação sexual.

Trabalhos experimentais em animais como os de Zeman (1967); Sima (1973); Silva et al. (1999) e Nunes et al. (2002), identificaram a dependência direta do desenvolvimento e da dieta, salientando transtornos mais severos nas etapas iniciais. Os efeitos celulares da desnutrição dependem da fase de crescimento do animal e do tempo de desnutrição, podendo ocorrer alterações na concentração de nutrientes no sangue e nos tecidos, alterações enzimáticas e mau funcionamento de órgãos e tecidos do corpo podendo ocasionar a morte (WINICK; NOBLE, 1966).

Evidências clínicas também indicam que certos tipos de transtornos alimentares são fatores de risco para ansiedade, pois 83% de indivíduos que possuem anorexia nervosa, já tiveram pelo menos uma vez na vida diagnóstico de transtorno de ansiedade. Além disso, vários aspectos da gravidez e do parto podem ser afetados pela baixa disponibilidade de alimentos, incluindo a incidência de aborto espontâneo, tempo de duração da gestação, óbitos fetais, dentre outros (GODART et al., 2000).

No sistema nervoso, a desnutrição pode ser comprometedora, pois sua organização tem início na embriogênese, finalizando seu desenvolvimento no período de 2 a 4 anos de vida. Sendo assim, as lesões nutricionais podem afetar a estrutura histológica e bioquímica dos órgãos desse sistema, alterando a maturação e funções (GALANOPOULO; MOSHÉ, 2002).

Sendo, os tecidos musculares a principal fonte imediata de proteína, o comprometimento do músculo esquelético representa uma forma adaptativa a redução da entrada do nutriente (DROTT; LUNDHOLM, 1992). O tecido muscular esquelético se mostra sensível à desnutrição por apresentar-se susceptível às alterações na diferenciação das fibras musculares (ALVES; DÂMASO; DAL PAI, 2008), cuja formação é regulada pela ativação, proliferação e diferenciação de várias linhagens de células miogênicas, além de depender da expressão e da atividade de fatores transicionais (MELO et al., 2011).

Ao longo dos anos, várias pesquisas estudaram a relação dos processos de desenvolvimento que incidem durante estágios iniciais da vida, como o estado de saúde do indivíduo. Barker (1995) foi pioneiro na realização de pesquisas que evidenciassem a associação do baixo peso ao nascer com a ocorrência de doenças relacionadas à síndrome metabólica no adulto como a hipertensão, a diabetes tipo II e doenças cardiovasculares. A subnutrição fetal ou no primeiro ano de vida, quando acompanhada de plena recuperação nutricional ou até excesso de peso/obesidade, representa um fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular coronariana.

A desnutrição intrauterina tem sido uma das principais causas de morbidez nas primeiras horas após o nascimento. Trabalhos clínicos evidenciam que crianças submetidas à desnutrição intrauterina são mais predispostas a desenvolver hipertensão arterial e também apresentam maior mortalidade por doenças cardíacas quando atingem a maturidade (BARKER et al., 1993; BARKER, 1996).

2.2 SUBNUTRIÇÃO E A DIETA PADRÃO DE MOÇAMBIQUE

A diminuição da incidência global da desnutrição, o número de pessoas com fome, por falta de acesso ao alimento, tem aumentado devido à crise alimentar e econômica mundial que se vive presentemente. Na África Oriental mostram um aumento, que continua a ser o problema mais importante de saúde pública principalmente nos países mais pobres, devido a sua magnitude e consequências desastrosas para o crescimento, o desenvolvimento e a sobrevivência das crianças (MONTE, 2000).

Entre os anos de 2004 e 2006, países como: Angola, Burundi, Chade, Eritreia, Etiópia, Haiti, Libéria, Madagáscar, Moçambique, República Centro-africana, República Democrática do Congo, República Unida da Tanzânia, Ruanda, Serra Leoa, Togo, Zâmbia e Zimbabuê,

localizados no continente africano, o predomínio da desnutrição foi superior ou igual a 35% da população total, esses países caracterizam a maioria das crianças com desnutrição aguda grave. Sendo Moçambique um país da África subsaariana, compõem-se próximo de 25 milhões e meio de habitantes, e situado no sudoeste africano, localizando-se na figura 1 (BLACK et al., 2008).

A estimativa da FAO quanto a fome (o que chama "subnutrição") é baseada em dados de abastecimento de alimentos que são convertidos em percentagem da população abaixo de um corte de energia mínima. Taxas de desnutrição estão em declínio, apesar os números absolutos de pessoas com fome na África subsaariana estão a aumentar (FAO, 2014).

Os países da África Subsaariana revelam progressos insuficientes para se alcançar o primeiro Objetivo de Desenvolvimento do Milênio de reduzir pela metade a proporção de pessoas que sofrem de fome até 2015, sendo apenas nove dos 46 países da África Subsaariana que atingem esse objetivo. Taxas de desnutrição crônica diminuem lentamente em 0,1% ao ano, ainda permanecendo em 39% para o continente. Os países africanos também revelam limitadas evidências de sucesso na redução da prevalência de baixo peso (STEVENS et al., 2012) com deficiências de micronutrientes. A média de vitamina A é deficiente, em torno de 30-40%; a anemia por deficiência de ferro é cerca de 40% das mulheres africanas (não grávidas). Em crianças menores de cinco anos, as estimativas ainda mais evidentes, chegando a 60% em alguns países africanos. Analisando os efeitos da má nutrição para os indivíduos e para a sociedade, o estado nutricional pobre impede o desenvolvimento de ambos (HOLDSWORTH, 2015).

Figura 1 - Continente Africano

Fonte: (INEGI, 2015)

Legenda: Moçambique se localiza no sudoeste africano.

Li et al. (2003), definem a desnutrição crônica (DC) como baixa estatura para a idade, diferente da desnutrição aguda (DA), compreendida como baixo peso para a altura. A DA pode manifestar-se em qualquer fase da vida e é passível de recuperação; já a DC é causada pela DA no período da vida entre a concepção e os primeiros dois anos de idade, e não é tratada. Por estabelecer uma fase crítica de desenvolvimento do organismo, os danos ocasionados pela DA não podem ser recuperados depois dos dois anos de idade. Assim, a DC é originada pela desnutrição tanto da mãe antes e durante a gravidez e na lactação, bem como da criança durante os primeiros dois anos de vida, com metade da alteração no crescimento, ainda no interior do útero, e a outra metade após o nascimento.

Estudos realizados no Departamento de Pediatria do Hospital Central, de Maputo (capital de Moçambique) a desnutrição está em quarto lugar em internações, depois de doenças como a malária, diarreia e infecção do trato respiratório. Esse estudo comprova ainda um aumento na incidência de desnutrição grave, o que faz com que proporcione uma das maiores taxas de mortalidade, chegando a 20% (JULIEN et al., 1995). O estado nutricional e clínico de crianças internadas na enfermaria do Hospital Central de Maputo devido à desnutrição, entre 1983 e 2001, ressaltaram que o número de crianças internadas em 2001 foi menor do que em 1983, porém a percentagem de crianças severamente abaixo do peso

aumentou, com a elevação do número de infecções secundárias, principalmente broncopneumonia e malária (CARTMELL et al., 2005).

A digestibilidade e sua qualidade proteica na dieta definem a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos, ou de qualquer outro composto nitrogenado pelo organismo (HIANE et al., 2006). As proteínas, onde suas ligações peptídicas não são hidrolisadas pelo processo digestivo, são excretadas nas fezes ou sofrem transformações no intestino grosso (MACEDO; DAMICO, 2000).

Estudos revelam que as proteínas de origem animal proporcionam uma boa absorção de aminoácidos pelo organismo: Caseína teor proteico de 81,57% (PIRES et al., 2006), digestibilidade da ordem de 96% (SGARBIERI, 1987) e de 93,33% (PIRES et al., 2006), as proteínas de origem vegetal são mais resistentes à ação de enzimas (CARIAS et al., 1995) e a proteína texturizada de soja: conteúdo proteico em torno de 53,28%, com digestibilidade de 86,41%. Conforme descrito por Freitas e Naves (2010), sementes oleaginosas contém outros compostos químicos como fitoesteróis, selênio e tocoferóis que potencializam sua ação antioxidante, inibitória de estresse oxidativo.

O milho amplamente cultivado nas comunidades de Moçambique, nutricionalmente vital, através da cultura e crenças sociais da dieta local. A comunidade consome milho em quase todas as refeições, fervida com água, sal e feijão ou amendoins. No entanto, o milho descascado acarreta graves problemas de subnutrição desde o valor nutricional e a falta de conhecimento sobre a importância de uma dieta equilibrada de alimentos. “Só mudo a alimentação quando estou farto de comer algo que tem sempre o mesmo sabor, por exemplo, de feijão para folhas de mandioca” (COUVINHA, 2012).

2.3 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO MIOCÁRDIO

Junqueira e Carneiro (2004) descrevem o coração como uma estrutura constituída por três túnicas, sendo a interna ou endocárdio, a média ou miocárdio e a externa ou epicárdica. O músculo cardíaco e as válvulas cardíacas são sustentados por um esqueleto de tecido conjuntivo denso, denominado esqueleto cardíaco. O endocárdio reveste o coração internamente por tecido endotelial liso com células pavimentosas poliédricas compostas por grande quantidade de fibras colágenas e poucas elásticas. O miocárdio como camada mais

espessa do coração, é formado por feixes de fibras musculares cardíacas dispostas em várias direções e separadas por septos de tecido conjuntivo extremamente vascularizado, envolvendo as cavidades cardíacas. A sua espessura está relacionada à resistência encontrada no bombeamento de sangue pelas diferentes câmaras (SPENCE, 1991).

O septo interventricular, denominado como uma espessa parede curva que divide a cavidade cardíaca transversal em duas metades, direita e esquerda, surgindo os respectivos ventrículos, direito e esquerdo (VAZZOLER, 2008). Os ventrículos são compostos por três camadas denominadas subepicardial, média e subendocondral, contendo fibras que se entrelaçam e se deslocam entre si (NICKEL, 1981).

As células musculares ou miócitos evidenciam próximas a um terço do número de células cardíacas, sendo seu volume dois terços do miocárdio (WEBER, 1989). A musculatura da parede ventricular esquerda é mais espessa quando comparada com a parede ventricular direita, conforme o maior trabalho realizado para impedir o sangue através de vasos que conduzem para o corpo todo, dispondo-se em feixe superficiais e profundos (VAZZOLER, 2008).

Nagano et al. (1993) descrevem, que os miócitos proliferam por todo desenvolvimento fetal e pós-natal precoce e o desenvolvimento é interrompido aproximadamente nas duas semanas de vida pós-natal. O crescimento cardíaco, após essas duas semanas de idade, advém por um aumento no tamanho dos miócitos e não por aumento em número.

O tecido conjunto do miocárdio sofre alterações na arquitetura, no arranjo e na quantidade de tecido conjuntivo, especialmente das fibras colágenas, através da alteração do trabalho e da modificação da função cardíaca. No mecanismo ventricular, o tecido conjuntivo permite contrair e relaxar o músculo cardíaco, e também tem a função de nutrição, defesa, sustentação e preenchimento (GANONG, 1989). De acordo com Spence (1991), o tecido conjuntivo é constituído por três camadas, o epimísio que envolve o músculo cardíaco, o perimísio que envolve feixes de fibras musculares cardíacas, e o endomísio situado entre as células musculares cardíacas.

A formação do coração é através de três tipos de músculo estriado cardíaco: o músculo atrial, o músculo ventricular e as fibras musculares especializadas excitatórias que constituem o sistema estimulante de condução do coração. Duas “bombas” que separam por um septo com paredes espessas e quatro câmaras, duas inferiores (ventrículos) duas superiores (átrios) separados pelo tecido fibroso. A contração do músculo cardíaco tem ritmicidade intrínseca que permite originar os estímulos dos batimentos cardíacos e o conduz através do coração, independentemente da estimulação extrínseca (ARAÚJO, 2007).

No desenvolvimento do coração, as células deste órgão participam de processos primários simultâneos e independentes como, crescimento ou multiplicação celular; diferenciação ou aparecimento de novas características celulares; morfogênese, isto é, movimento, adesão, separação e organização espacial das células; e a morte celular programada (DEHAAN; O'RAHILLY, 1981).

De acordo com Weber et al. (1987), para que o coração funcione em condições ideais, seus compartimentos contrátil, vascular e intersticial devem estar em equilíbrio entre si. Enquanto os cardiomiócitos e os vasos coronários representam os fundamentos para a função contrátil e viabilidade do miocárdio, igualmente deve-se considerar a matriz extracelular, ou interstício cardíaco (WEBER, 1989).

No final da sexta semana após a fertilização humana, o coração define sua forma geral (MALINA; BOUCHARD, 1991), em camundongos corresponde à segunda semana de gestação (OTIS; BRENT, 1954). O formato e o aspecto cardíacos se desenvolvem em resposta as mudanças no volume de fluxo sanguíneo intrauterino e pressão intraluminal (BRASEL; GRUEN, 1978). O tamanho do coração humano aumenta desde o nascimento até a maturidade, com uma curva crescente paralela ao peso corpóreo (MALINA; BOUCHARD, 1991).

2.3.1 Alterações do miocárdio devido à subnutrição

As fases do crescimento e desenvolvimento são observadas em todo organismo e podem ser modificados por fatos exógenos através das alterações nutricionais (MORGANE et al., 1978), e efeitos adversos da desnutrição não poupam o coração (FIORETTO et al., 2002). A desnutrição impede o crescimento e causa um desgaste generalizado dos tecidos, como perda do tecido muscular, inclusive o músculo cardíaco (BERGMAN et al., 1988).

As alterações morfológicas perinatais que incidem no sistema cardiovascular do rato não são exatamente iguais às que acontecem no homem. As mudanças no rato são rápidas no sistema cardiovascular e estão relacionadas com o rápido crescimento do animal, cujo peso corporal aumenta 40% no primeiro dia pós-natal e no recém-nato este mesmo peso dobra em 4 ou 5 dias de vida pós-natal (MOMMA et al., 1992). No período pós-natal precoce, o crescimento do miocárdio adapta-se ao crescimento rápido, ao desenvolvimento do animal e

as alterações nos padrões do fluxo sanguíneo que acontecem logo após o nascimento (MANDARIM-de-LACERDA; SOUZA, 1994).

De acordo com Cicogna (1999), evidências em humanos e, especialmente em animais de experimentação, onde a desnutrição proteico-calórica pode causar danos ao sistema cardiocirculatório, como na clínica a variação de bradicardia a insuficiência cardíaca; na funcional a redução do débito cardíaco, da complacência ventricular e da contratilidade miocárdica; bioquimicamente como ativação da proteinase cálcio dependente, diminuição da síntese proteica, da relação RNA/DNA e aumento do DNA e morfológica a dilatação das câmaras cardíacas, atrofia e/ou degeneração dos miócitos, edema intersticial e mitocondrial e aumento do colágeno.

Estudos revelam que durante a desnutrição há um aumento na densidade capilar junto a uma diminuição do lúmen dos capilares, a proporção no número de capilares por miócitos e a fração de volume e densidade de superfície dos capilares não alteraram, mas houve diminuição significativa da distância máxima da difusão dos metabólitos no ventrículo esquerdo através do predomínio direto no metabolismo de corações desnutridos (VANDEWOUDE, 1995).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Com o panorama dos efeitos da subnutrição sobre órgãos e tecidos vitais para o desenvolvimento humano, torna-se necessário elucidar as reais repercussões causadas sobre o miocárdio, investigando em sua morfologia e possíveis alterações.

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Considerando-se a importância do estado nutricional para o desenvolvimento e a higidez dos diferentes órgãos e tecidos, e os efeitos deletérios determinados por diferentes estados de subnutrição, a presente pesquisa que, ao reproduzir em laboratório uma dieta hipoprotéica e a dieta básica consumida pela população de Moçambique, visa avaliar as suas repercussões nos componentes do miocárdio do ventrículo esquerdo de ratos Wistar jovens.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar, no miocárdio do ventrículo esquerdo (VE) de ratos Wistar com 21 e 42 dias de vida (nutridos, subnutridos, e submetidos à dieta de Moçambique), com o uso de técnicas rotineiras de histologia, morfometria, estereologia e microscopia eletrônica de transmissão (MET):

- a) a área total dos ventrículos;
- b) a área total e interna do VE;
- c) a espessura das paredes do VE;
- d) a espessura de cardiomiócitos;
- e) a densidade de volume de núcleos de cardiomiócitos;
- f) a ultraestrutura de cardiomiócitos.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

Este tópico descreve a metodologia do estudo, onde a presente pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo (ICB III – USP).

4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas, com peso entre 280 e 320 gramas, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) e acondicionados em gaiolas de polipropileno, dispostos em estante vertical no Biotério do ICB III. Os animais foram mantidos em salas climatizadas, com temperatura controlada entre 23 e 25°C, e em ciclo de claro/escuro de 12h. Tendo como base a dieta AIN-93G (REEVES, 1993) foram preparadas por laboratório bioquímico especializado (Rhoster) uma dieta contendo 20% de caseína (N), e uma dieta contendo 5% de caseína (S). Além dessas, preparou-se uma dieta contendo proteína vegetal, com componentes que simulam aquela fornecida à população de Moçambique (M) constituída por farinha de milho, farinha de amendoim torrado, couve liofilizada. Todas as dietas continham mix mineral e mix vitamínico AIN-93 (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição das rações, sendo o conteúdo proteico da ração M é extraído do amendoim

Dieta AIN-93G	Dieta Normoprotéica (%)	Dieta Hipoprotéica (%)	Dieta Padrão Moçambique (%)
Umidade	8,4	7,8	4,75
Proteína Bruta	20	5,2	16,25
Extrato Etéreo	7,2	7,0	24,16
Matéria Fibrosa	4,1	5,0	0,96
Matéria Mineral	2,8	2,8	3,31
Carboidrato	58,95	72,2	50,57
Caloria	3,8% kcal/g	3,73% kcal/g	4,85% kcal/g

Fonte: (RHOSTER, 2012)

Legenda: Quantidade presente por kg de ração.

Depois de ambientados no biotério, os animais foram acasalados, mantendo-se na mesma gaiola, durante 10 dias, um macho para 2 fêmeas (sistema poligâmico). Durante esse período, as dietas N, M e S foram oferecidas a grupos distintos, sem restrições de água.

Decorrido o período de acasalamento, durante a gestação, as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais de acordo com as respectivas dietas, e mantidas durante o período de amamentação juntamente com os filhotes.

Como o número de filhotes por ninhada variou de 06 a 12 filhotes, estabeleceu-se como número padrão, 6 filhotes por fêmea, dando-se preferência para os indivíduos machos. Para tanto, após o terceiro dia de vida extrauterina (V.E.U.), realizou-se a exclusão através da sexagem considerando-se além da distância ano-genital (maior nos machos), a visualização do escroto. As ninhadas cujas mães se alimentaram de seus filhotes, foram sumariamente descartadas (Figura 2).

Figura 2 - Sexagem de ratos Wistar

Fonte: (RIBEIRO, L., 2014).

Legenda: Distância ano-genital em filhotes fêmeas (A) e machos (B), no terceiro dia V.E.U.

Os grupos: nutrido (N21), subnutrido (S21) e Moçambique (M21) foram formados por animais de 21 dias V.E.U, época determinada para o desmame. Animais mantidos com as respectivas dietas a partir do 22º dias V.E.U até o 42º dias constituíram os grupos N42, M42 e S42 (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma do período experimental

Fonte: (RIBEIRO, L., 2015).

Legenda: Representação esquemática da obtenção dos grupos experimentais N21, M21, S21, e N42, M42, S42.

4.2 AVALIAÇÃO METABÓLICA

No decorrer desse período, durante sete dias após o desmame (período entre o 22º e 28º dias) denominado S1 (Semana 1), e sete dias antes da eutanásia no 42º dia de vida (período entre 36º e 42º dias) denominado S2 (Semana 2), os animais dos grupos N42, M42 e S42 foram monitorados individualmente em gaiolas metabólicas para controle diário de ingestão de ração e água, coleta de fezes e urina (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Gaiola metabólica

Fonte: (RIBEIRO, L., 2014)

Legenda: (A) Estante vertical composta por 12 gaiolas metabólicas; (B) Gaiola metabólica: bebedouro (→ amarelo), comedouro com recipiente de desperdício (→ vermelho), tubo coletor de desperdício de água (→ azul), tubo coletor de fezes (→ amarelo), e tubo coletor de urina (→ verde).

Figura 5 - Gaiola metabólica com animal

Fonte: (RIBEIRO, L., 2014).

Legenda: Animal monitorado individualmente na gaiola metabólica.

4.3 HISTOLOGIA

Os animais de todos os grupos de 21 e 42 dias foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico (pentobarbital sódico). Após uma incisão mediana ventral na caixa torácica e secção completa dos vasos da base, o coração foi retirado e imediatamente imerso em solução fixadora de formol a 10%, por um período de 2 horas. Findo esse período, os átrios foram retirados através de incisão transversal no sulco coronário, e o segmento correspondente aos ventrículos foi dividido nas partes basal, média e apical, através de duas secções transversais, conforme ilustra a Figura 6.

Figura 6 - Coração de rato Wistar

Fonte: (RIBEIRO, L., 2013)

Legenda: (A) Coração de rato onde a linha pontilhada indica a separação entre átrios e ventrículos, estes, subdivididos nas partes Basal, Média e Apical; (B e C) Aspectos anterior e superior da parte média.

Em seguida, a parte média de cada coração foi novamente imersa na mesma solução fixadora durante um período de quatro dias, e preparada para técnicas rotineiras de histologia. Desta forma, cortes semi-seriados transversais (paralelos à superfície da parte média) com 5µm de espessura foram submetidos às técnicas de coloração da hematoxilina-eosina (HE) para evidênciação dos cardiomiócitos e seus núcleos (BEHMER et al., 1975); Resorcina-fucsina (WEIGERT, 1898) para fibras elásticas, e do Picrosirius analisado sob luz polarizada (JUNQUEIRA et al., 1979), para a tipificação das fibras colágenas.

4.4 MÉTODOS QUANTITATIVOS

4.4.1 Determinação da área e da espessura do Ventrículo Esquerdo (VE)

As áreas ventricular total (AV), externa do ventrículo esquerdo (AEVE) e interna do ventrículo esquerdo (AIVE) foram determinadas (em mm²) nos cortes corados pela HE analisados sob lupa estereoscópica (Stemi SV6 - Zeiss), em imagens obtidas através de um sistema computadorizado (Axiovision 4.8 – Zeiss). Nas mesmas imagens determinou-se, em mm, a espessura das paredes do ventrículo esquerdo (EVE), em quatro regiões equidistantes, a partir da parede septal, conforme ilustra a Figura 7.

Figura 7 - Áreas e espessuras analisadas nos cortes corados pela HE

Fonte: (RIBEIRO, L., 2014)

Legenda: **Corte transversal da parte média do ventrículo de rato Wistar.** Contornos das Áreas: Ventricular total - AV (linha preta), Externa do Ventrículo Esquerdo – AEVE (linha vermelha), e Interna do Ventrículo Esquerdo – AIVE (linha azul). As linhas brancas representam os locais de obtenção da espessura das paredes do Ventrículo Esquerdo - EVE. (Barra de calibração 1 mm).

4.4.2 Estereologia para a determinação da densidade de volume de núcleos de cardiomiócitos

Também nas lâminas coradas pela HE, e com o uso do mesmo sistema computadorizado (Axiovision, Zeiss 4.8) e de um microscópio binocular com objetiva de 100x sob imersão, foram adquiridas em um mesmo corte imagens de cinco campos da parede ventricular esquerda. Foram fotografados um campo na área septal (S), dois na parede anterior (A1, A2) e dois na parede posterior (P1, P2). Este procedimento foi realizado em cinco cortes por animal de cada grupo, totalizando 25 imagens por animal.

Em seguida, foi sobreposto à imagem de cada campo um sistema teste contendo um total de 300 pontos (P_T). Considerando-se a fórmula $V_v = P_P/P_T \times 100 (\%)$ onde, de acordo com Madarim-de-Lacerda (1991), P_P é o nº de pontos que atinge o núcleo de cardiomiócitos, determinou-se para cada animal de todos os grupos, a densidade de volume de núcleos de cardiomiócitos (V_v). A localização dos campos e o sistema-teste estão representados na figura 8.

Figura 8 - Campos obtidos nos cortes corados pela HE

Fonte: (RIBEIRO, L., 2014)

Legenda: **Corte transversal da parte média do ventrículo de rato Wistar.** Campos do ventrículo esquerdo (imagem à esquerda): área septal (S), e paredes: anterior (A1, A2) e posterior (P1, P2), (Barra de calibração: 1 mm). Em maior aumento (imagem à direita), o sistema-teste sobreposto na imagem de um campo da parede anterior (A1), onde se evidenciam os núcleos de cardiomiócitos (setas pretas) (Barra de calibração: 100 µm).

4.4.3 Espessura de cardiomiócitos

Este parâmetro, também denominado **dimensão transversal** (NOSZCZYK-NOWAK et al., 2009) foi obtido nos cortes corados pela HE em 150 cardiomiócitos por animal de cada grupo. Os dados foram obtidos em μm , através de uma reta passando pelo ponto mais central do núcleo de cada cardiomiócito, como ilustra a Figura 9.

Figura 9 - Espessura de cardiomiócitos

Fonte: (RIBEIRO, L., 2015)

Legenda: Determinação da espessura (dimensão transversal) de cardiomiócitos. Notar as retas cruzando a parte central dos núcleos. (Barra de calibração 100 μm).

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para essa metodologia foram utilizados três animais de cada grupo. Após anestesia com Ketamina/Xilasina/Acepromasina (0,7/0,2/0,1v/v, 0,8/100 g peso corporal), realizou-se uma incisão ventral na linha mediana da região torácica, a fim de se expor o coração. Em seguida, procedeu-se inicialmente à perfusão de uma solução salina estéril, através da introdução da agulha no ápice cardíaco do ventrículo esquerdo, e incisão do átrio direito para extravasamento do sangue. Para a fixação dos tecidos, perfundiu-se posteriormente uma solução de Karnovsky modificada, contendo 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído (0,1 M) em tampão fosfato de sódio (PBS - pH 7,3). Os corações foram retirados e o

segmento médio do VE de cada animal de todos os grupos foi imerso em solução contendo 2,5% de glutaraldeído por 2 horas. Em seguida, após lavagem em PBS, fragmentos de aproximadamente 2 mm de cada espécime foram pós-fixados em tetróxido de Ósmio a 2% por duas horas a 4 °C. Depois de corados com acetato uranila por um período de 12 horas, desidratados em série crescente de álcoois (60% até 100%) os fragmentos foram incluídos em resina pura. Cortes semifinos (400nm) foram corados com azul de toluidina, a fim de selecionar as áreas adequadas para a obtenção dos cortes ultrafinos (60 nm) (Leica Ultracut UCT). Estes, após contrastados com acetato de uranila a 4% (WATSON, 1958) e citrato de chumbo a 0,4% (REYNOLDS, 1963), foram dispostos em tela de cobre de 200 “mesh” para análise ao microscópio eletrônico de transmissão, do Laboratório Multiusuário de Histologia e Microscópica Eletrônica do Departamento de Anatomia.

4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram expressos em média $\pm$ DP. Os dados metabólicos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com dois fatores: grupo (N, M e S) e semanas (S1 e S2), sendo medidas repetidas em semanas, seguidas por comparações múltiplas pelo método de Bonferroni. Em relação aos demais parâmetros do estudo, a análise estatística foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA) com dois fatores: grupos (N, M e S) e idade (21 e 42 dias), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$ (ZAR, 1984).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados foram obtidos através das análises qualitativas e quantitativas representados por tabelas (com média $\pm$ DP) e gráficos.

5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E COMPORTAMENTAIS GERAIS

Algumas diferenças físicas e comportamentais foram observadas entre os grupos experimentais N, M e S, a partir do protocolo realizado e durante o monitoramento em gaiolas metabólicas. Independentemente do grupo avaliado, as ninhadas foram numerosas. Todavia, a maior incidência de natimortos, de morte pós-natal e canibalismo ocorreu nos animais do grupo S; fenômenos raramente observados nos grupos N e M.

Relativamente à pelagem, enquanto que o aspecto padrão do grupo N foi também observado nos animais do grupo M, o grupo S destacou-se pelo atraso no seu aparecimento, presença de pelos curtos, menos vistosos e de distribuição escassa.

Tomando-se o grupo N como padrão quanto ao comprimento do animal, aparentemente o grupo S exibiu o menor tamanho, e o grupo M um comprimento intermediário (Figura 10).

Figura 10 - Comprimento naso-anal dos animais

Fonte: (RIBEIRO, L., 2014)

Legenda: Comprimento dos animais dos grupos experimentais: N21e N42, M21 e M42, S21 e S42.

Quando se analisou o padrão de comportamento animal, como a atividade de locomoção na caixa, notou-se que em torno dos 15 dias de vida, os filhotes dos grupos N e M já se locomoviam livremente, enquanto que o grupo S era hiperativo, com isso, esvaziava o recipiente da ração espalhando-a pela caixa, favorecendo a reposição da ração com maior frequência.

Nas semanas de monitoramento nas gaiolas metabólicas (S1 e S2), o comportamento dos animais dos grupos N e M foi equilibrado quanto ao consumo de ração e água, bem como de excreção de fezes e de urina. Já os animais do grupo S exibira um comportamento hiperativo e se refugiavam no compartimento da ração por serem menores que os animais N e M.

5.2 ASPECTOS QUALITATIVOS

5.2.1 Morfologia dos ventrículos

Cortes transversais da parte média dos ventrículos de todos os grupos (N21, M21, S21, e N42, M42, S42) corados pelo método hematoxilina-eosina (HE) estão ilustrados na figura 11. Ao se comparar os animais de 21 dias entre si, verifica-se um ligeiro aumento do contorno dos ventrículos no grupo N. Porém, a maior espessura da área septal (S) e da parede do ventrículo direito (VD) foram detectadas no grupo M. Dos 21 aos 42 dias, o contorno dos ventrículos do grupo N42 praticamente dobrou em relação ao grupo N21, enquanto que esse aumento foi discreto entre os grupos M42 e M21. Muito embora a espessura do septo tenha apresentado um aumento aparente, não foram notadas diferenças quanto ao contorno dos ventrículos entre os animais S42 e S21.

Figura 11 - Morfologia do corte transversal ventricular dos grupos experimentais

Fonte: (RIBEIRO, L., 2014)

Legenda: Morfologia do miocárdio no corte transversal dos animais dos grupos experimentais: N21 e N42, M21 e M42, S21 e S42. Campo do ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD) e área septal (S) (Barra de calibração: 1 mm).

5.2.2 Núcleos de cardiomiócitos

Diferenças foram notadas ao se comparar o aspecto dos núcleos nos diferentes grupos. Desta forma, verificou-se que nos animais dos grupos N21 e N42, predominaram núcleos com contorno arredondado ou ovalado, e nos animais dos grupos S21 e S42, núcleos de aspecto preferencialmente alongado. Embora nos grupos M21 e M42 tenham sido detectados núcleos arredondados ou ovalados, predominaram nesses animais os núcleos de aspecto alongado (Figura 12).

Figura 12 - Núcleos de cardiomiócitos

Fonte: (RIBEIRO, L., 2014)

Legenda: Núcleos de cardiomiócitos dos grupos experimentais: N21 e N42, M21 e M42, S21 e S42 dias. Notar o aspecto alongado dos núcleos (setas pretas) e arredondado/ovalado (setas brancas) (Barra de calibração: 25 µm).

5.2.3 Tipificação das fibras colágenas e das fibras elásticas

Nas laminas coradas pelo método de Picrosirius analisadas sob luz polarizada observou-se que, no período de 21 dias, predominaram as fibras do Tipo I (amarelo, laranja, vermelho) nos grupos N21 e M21. Nessa fase, foi nítido o predomínio das fibras do Tipo III (verde) nos animais subnutridos (S21).

Quando se analisou os grupos da fase de 42 dias, nos grupos M42 e S42, muito embora tenham sido detectadas fibras do tipo I (amarelas), predominaram as fibras do Tipo III (verdes). Comparativamente, ocorreu uma diminuição aparente na densidade das fibras Tipo I no grupo N42 (Figura 13).

Figura 13 - Técnica de Picrosírius

Fonte: (RIBEIRO, L., 2015)

Legenda: Fibras colágenas dos Tipos I (vermelho, laranja, amarelo) e III (verde) no miocárdio de animais nutridos (N21, N42); subnutridos (S21, S42), e Moçambique (M21, M42). (Picrosírius, sob luz polarizada - barra de calibração: 25 µm).

Ao se analisar as lâminas coradas pelo método de Weigert, a fim de se evidenciar as fibras elásticas, notou-se que, tanto no período de 21 dias como no de 42 dias, não foram detectadas fibras elásticas no miocárdio dos animais de todos os grupos (N, S, M). Todavia, a principal diferença observada, foi a presença de uma delgada camada dessas fibras constituindo o epicárdio dos grupos N e M, em contraste com o grupo S, onde elas não foram notadas nessa região (Figura 14).

Figura 14 - Técnica de Weigert

Fonte: (RIBEIRO, L., 2015)

Legenda: Disposição das fibras elásticas no miocárdio de indivíduos dos grupos: nutrido (N), subnutrido(S) e Moçambique (M). Notar a presença dessas fibras no epicárdio dos grupos N e M (setas), e na parede dos vasos (V). (Weigert, barra de calibração: 25 µm).

5.2.4 Ultraestrutura dos cardiomiócitos

Sob a microscopia eletrônica de transmissão (MET), aos 21 dias, os cardiomiócitos dos grupos N e M exibem o sarcômero com a linha Z bem definida e com densidade escura, contrastando com os animais S, onde Z apresenta irregular e com densidade clara. Da mesma forma, a linha M destaca-se nos grupos N e M, não sendo possível detectá-la no grupo S. Quanto à faixa I nota-se que a mesma é mais larga no grupo M, onde também é maior a distância entre as linhas Z (limites de um sarcômero). Nessa fase, a região granular dos núcleos é predominante no grupo S, enquanto que nos animais dos grupos N e M, há uma proporcionalidade aparente na distribuição das zonas granular e fibrilar (Figura 15).

Aos 42 dias, não foram notadas diferenças significativas entre os grupos (N42, S42, M42) quanto aos aspectos ultraestruturais dos cardiomiócitos, desde o comprimento dos sarcômeros, até a constituição das suas partes (linhas e faixas). Todavia, em alguns cardiomiócitos do grupo S ainda foram notadas linhas Z com disposição irregular (Figura 16).

Figura 15 - MET dos cardiomiócitos e os nucléolos dos cardiomiócitos dos grupos de 21 dias

Fonte: (RIBEIRO, L., 2015)

Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos cardiomiócitos dos grupos N21, S21 e M21, evidenciando a constituição dos sarcômeros (seta branca/ linha Z; estrelas laranja/ faixa I; seta azul/ linha M e estrelas amarelas/ faixa A) e a estrutura dos nucléolos com as zonas fibrilar (fi) e granular (g) (Barra de calibração: 0,5 μ m).

Figura 16 - MET dos cardiomiócitos dos grupos de 42 dias

Fonte: (RIBEIRO L.,2015)

Legenda: Sarcômeros dos cardiomiócitos dos grupos de 42 dias, onde se observa os aspectos semelhantes entre os grupos, como a definição das linhas e faixas, bem como a distância entre as linhas Z, delimitando e extensão de um sarcômero, A seta destaca uma linha Z irregular em cardiomiócito do grupo S (Barras de calibração: 1,0 e 0,5 μ m).

5.3 ASPECTOS QUANTITATIVOS

Neste item os grupos experimentais (N, M e S) estão representados por média ($\pm$ DP) e serão descritos os resultados das análises estatísticas referentes às comparações entre os grupos.

5.3.1 Peso (corporal e do coração) e comprimento dos animais.

Os dados relativos a esses parâmetros são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Peso corporal, comprimento naso-anal, peso do coração e razão peso coração por peso corporal dos animais dos grupos N, M e S com 21 e 42 dias

		N	M	S
Peso ao Nascer ¹ (g)		8,8 $\pm$ 0,3	7,9 $\pm$ 0,6*	5,8 $\pm$ 0,5*#
Peso Corporal ² (g)	21d	53,5 $\pm$ 1,1	37,6 $\pm$ 2,8*	22,4 $\pm$ 1,2*#
	42d	184,4 $\pm$ 5,1 ^{\$}	79,9 $\pm$ 4,4* ^{\$}	25,0 $\pm$ 4,3*#
Comprimento Naso-Anal ³ (cm)	21d	11,6 $\pm$ 0,5	10,6 $\pm$ 0,4*	8,5 $\pm$ 0,0*#
	42d	16,9 $\pm$ 0,4 ^{\$}	14,9 $\pm$ 0,4* ^{\$}	9,7 $\pm$ 0,6*# ^{\$}
Peso do Coração ⁴ (g)	21d	0,38 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01*	0,17 $\pm$ 0,02*
	42d	0,77 $\pm$ 0,12 ^{\$}	0,26 $\pm$ 0,02*	0,15 $\pm$ 0,02*#
Peso do Coração/Peso Corporal ⁵ (%)	21d	0,71 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,04*	0,78 $\pm$ 0,05#
	42d	0,42 $\pm$ 0,07 ^{\$}	0,33 $\pm$ 0,04* ^{\$}	0,63 $\pm$ 0,10*# ^{\$}

Fonte: (RIBEIRO, L., 2015)

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; n=5 a 7 animais

¹ANOVA um fator: Grupo, p<0,001 (Tukey, S $\neq$ N, S $\neq$ M, M $\neq$ N, p<0,05)

²⁻⁵ANOVA dois fatores. ²⁻⁴Grupo x Idade, p<0,001. ⁵Grupo x Idade, p=0,013

* $\neq$ N, # $\neq$ M, ^{\$} $\neq$ 21d, (Tukey, p<0,05)

Ao se analisar o **peso corporal** ao nascer, em relação ao grupo N, o grupo M foi 10% menor, e o grupo S, 34% (Gráfico 1A).

Tendo como parâmetro o grupo N, aos 21 dias, o grupo M apresentou um **peso corporal** 30% menor, enquanto que o grupo S foi 58% menor. Com 42 dias, o grupo M apresentou peso 57% menor e o grupo S, 86%. Comparando-se os grupos de 21 dias com os de 42 dias, verificou-se que apenas os grupos N e M apresentaram aumento de peso corporal significante relativamente à idade (Gráfico 1B).

Diferenças significantes também foram notadas no **comprimento naso-anal** dos animais, ao se avaliar os fatores idade e grupo. Tanto aos 21 quanto aos 42 dias, os grupos exibiram diferenças de comprimento significantes entre si ($p < 0,05$). Com 21 dias, os grupos M e S foram, respectivamente, 9% e 27% menores que o grupo N. Aos 42 dias, o comprimento naso-anal do grupo M foi 12% menor e o do grupo S 43%, quando comparados ao grupo N. Todos os grupos apresentaram crescimento do comprimento naso-anal significante de 21 para 42 dias ($p < 0,05$). Desta forma, no grupo N esse aumento foi de 31%; no grupo M, de 29%, e no grupo S, de 14% (Gráfico 1C).

A análise da variável **peso do coração** permitiu verificar que, aos 21 dias, os grupos M e S apresentaram diminuição significante em relação ao grupo N ($p < 0,05$), correspondentes a 45% e 55%, respectivamente. Também se detectou diferenças significantes entre os grupos aos 42 dias ($p < 0,05$), com a diminuição de 66% no grupo M, e de 80% no grupo S, quando comparados ao grupo N. Com a idade, apenas o grupo N apresentou diferença significante de 21 para 42 dias ($p < 0,05$), quando o coração dobrou de peso (Gráfico 1D).

Essa relação muda ao se estabelecer a **razão peso do coração/peso corporal**, quando tanto na idade de 21 como de 42 dias, o grupo M exibiu valor menor do que os grupos N e S ($p < 0,05$). Quando comparado ao grupo N, o grupo S não apresentou diferença significante com 21 dias; porém, em 42 dias, o grupo S apresentou-se maior do que o grupo N ($p < 0,05$). Da idade de 21 para 42 dias, esse parâmetro diminuiu em todos os grupos ($p < 0,05$) (Gráfico 1E).

Gráfico 1 - Representação gráfica da média e desvio padrão do Peso Corporal ao Nascer (g) dos animais dos grupos N, M e S, Peso Corporal (g), Comprimento naso-anal (cm), Peso do Coração (g) e Razão Peso do Coração/Peso Corporal (%) dos animais N, M e S em 21 e 42 dias

Fonte: (RIBEIRO, L., 2015)

Legenda: **(A)** Peso ao Nascer (g). Foi detectada diferença significativa de peso ao nascer entre os grupos N, M e S, $p < 0,05$. **(B)** Peso Corporal (g). Foi detectada diferença significativa de peso entre os grupos N, M e S, em 21 e 42 dias, $p < 0,05$. Apenas os grupos N e M apresentaram diferença significativa de peso de 21 para 42 dias, $p < 0,05$. **(C)** Comprimento naso-anal (cm). Foi detectada diferença significativa de comprimento naso-anal entre os grupos N, M e S, em 21 e 42 dias, $p < 0,05$. Os grupos N, M e S apresentaram diferença significativa de comprimento naso-anal de 21 para 42 dias, $p < 0,05$. **(D)** Peso do Coração (g). Em 21 dias os grupos M e S apresentaram diferença significativa de peso do coração comparados ao grupo N, $p < 0,05$. Em 42 dias foi detectada diferença significativa de peso do coração entre os grupos N, M e S, $p < 0,05$. Somente o grupo N apresentou diferença significativa de peso do coração de 21 para 42 dias, $p < 0,05$. **(E)** Razão Peso do Coração/Peso Corporal (%). Em 21 dias o grupo M apresentou diferença significativa na razão peso do coração/peso corporal comparado aos grupos N e S, $p < 0,05$. Em 42 dias foi detectada diferença significativa na razão entre os grupos N, M e S, $p < 0,05$. Os grupos N, M e S apresentaram diferença significativa na razão de 21 para 42 dias, $p < 0,05$.

5.3.2 Análise metabólica

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se Análise de Variância com dois fatores, grupo e semana, considerando a semana como um fator de medida repetida. Os valores semanais representam a média dos valores obtidos diariamente no período de sete dias, S1 e S2 (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliações Metabólicas nas semanas S1 e S2 dos animais dos grupos N, M e S

		N	M	S
Massa Corporal (g) ¹	S1	77,1 ± 3,3	36,9 ± 1,9*	17,0 ± 0,8* [#]
	S2	154,0 ± 4,0 ^{\$}	62,0 ± 7,2* ^{\$}	21,8 ± 3,1* ^{##}
Ingestão Alimentar (g) ²	S1	9,9 ± 0,6	6,0 ± 1,2*	2,4 ± 0,7* [#]
	S2	14,5 ± 1,3 ^{\$}	9,5 ± 1,6* ^{\$}	3,1 ± 0,7* [#]
Ingestão Alimentar / Massa Corporal (%) ³	S1	12,8 ± 0,6	16,1 ± 2,9	14,2 ± 3,3
	S2	9,4 ± 0,7	15,2 ± 1,4	14,2 ± 1,6
Ingestão de Água (g) ⁴	S1	12,4 ± 2,2	8,6 ± 1,8	4,0 ± 0,2*
	S2	21,8 ± 2,6 ^{\$}	21,6 ± 9,2 ^{\$}	6,1 ± 1,9* [#]
Ingestão de Água / Massa Corporal (%) ⁵	S1	16,1 ± 2,7	23,5 ± 5,0	23,5 ± 2,5
	S2	14,2 ± 1,8	34,8 ± 14,6	27,6 ± 5,6
Excreção de Urina (g) ⁶	S1	4,4 ± 1,8	2,8 ± 0,9	0,8 ± 0,3
	S2	9,7 ± 1,7	8,8 ± 6,8	1,7 ± 1,0
Excreção de Urina / Ingestão de Água (%) ⁷	S1	34,7 ± 8,5	31,8 ± 4,2	19,4 ± 7,1
	S2	44,1 ± 3,4	36,5 ± 15,6	25,4 ± 10,1
Excreção de Fezes (g) ⁸	S1	1,05 ± 0,12	0,71 ± 0,16*	0,13 ± 0,06* [#]
	S2	1,81 ± 0,27 ^{\$}	1,29 ± 0,28* ^{\$}	0,35 ± 0,11* [#]
Excreção de Fezes / Ingestão Alimentar (%) ⁹	S1	10,6 ± 1,1	12,5 ± 4,8	5,3 ± 1,5* [#]
	S2	12,6 ± 1,9	13,7 ± 3,0	11,1 ± 2,6 ^{\$}

Fonte: (RIBEIRO L, 2015)

Dados expressos em média ± desvio padrão. N (n=5), M (n=8), S (n=6)

¹⁻⁹ANOVA dois fatores com medidas repetidas na semana. ^{1,2}Grupo x Semana, p<0,001; ³Grupo x Semana, p=0,060; Grupo, p<0,001 (Bonferroni: S≠N, p=0,009; M≠N, p<0,001, independente da Semana); Semana, p=0,025 (S2≠S1, independente do Grupo); ⁴Grupo x Semana, p=0,045; ⁵Grupo x Semana, p=0,062; Grupo, p=0,002 (Bonferroni: S≠N, p=0,018; M≠N, p=0,002, independente da Semana); Semana, p=0,066; ⁶Grupo x Semana, p=0,244; Grupo, p<0,001 (Bonferroni: S≠N, p<0,001; S≠M, p<0,001, independente da Semana); Semana, p<0,001 (S2≠S1, independente do Grupo); ⁷Grupo x Semana, p=0,713; Grupo, p=0,006 (Bonferroni: S≠N, p=0,007; S≠M, p=0,035, independente da Semana); Semana, p=0,017 (S2≠S1, independente do Grupo); ⁸Grupo x Semana, p=0,002; ⁹Grupo x Semana, p=0,001.

*N, #M, \$≠S1, (Bonferroni, p<0,05).

Com relação à **massa corporal**, foi observado aumento significativo de S1 para a S2 em todos os grupos, p<0,05. O grupo M apresentou aumento de 68%, S 28% e N 100%. Em S1, o grupo M apresentou 48% da massa corporal do grupo N e o grupo S 22%. Em S2, o grupo M apresentou 40% da massa corporal do grupo N e o grupo S 14% (Gráfico 2A).

Nos grupos N e M, os dados relativos à **ingestão alimentar** indicaram um aumento significativo no consumo de ração de S1 para S2 ($p<0,05$). Assim, esse aumento foi de 46% para o grupo N, e de 58% para o grupo M. Para esse parâmetro, o grupo S não apresentou aumento de S1 para S2. Tendo o grupo N como controle, tanto em S1 como em S2 a ingestão foi menor nos grupos M e S, $p<0,05$. Em S1, o grupo M ingeriu 39% a menos, e o grupo S 76% a menos; em S2, a ingestão foi, respectivamente, 34% e 79% menor (Gráfico 2B).

Essas relações mudam quando se estabelece, em porcentagem, a **razão ingestão alimentar/massa corporal**. Independente da semana, os grupos M e S apresentaram maior razão do que o grupo N ($p<0,001$ e $p=0,009$, respectivamente); já entre os grupos M e S, não foram detectadas diferenças significantes. Também, independente do grupo, houve diminuição na porcentagem dessa razão de S1 para S2, $p=0,025$ (Gráfico 2C).

A **ingestão de água** aumentou de S1 para S2 nos grupos N (76%) e M (151%), $p<0,05$; no grupo S, esse aumento não foi significativo. Em S1 somente, o grupo S ingeriu 68% a menos de água do que o grupo N ($p<0,05$). Já em S2, o grupo S ingeriu 72% a menos de água do que os grupos N e M, $p<0,05$ (Gráfico 2D).

Quanto a **razão ingestão de água/massa corporal**, não foram observadas diferenças significantes entre S1 e S2, $p=0,066$. Porém, independente da semana, os grupos M e S apresentaram maior porcentagem do que o grupo N ($p=0,002$ e $p=0,018$ respectivamente), ou seja, em torno de 14% para o grupo M, e de 10% para o grupo S (Gráfico 2E).

Quando analisado o parâmetro do volume de **excreção de urina**, independente do grupo houve aumento significativo (em média, 162%) de S1 para S2, $p<0,001$. Independente da semana, o grupo S excretou em média 80% a menos que os demais grupos, $p<0,001$ (Gráfico 2F).

Esses resultados se mantiveram quando analisada a **razão excreção de urina/ingestão de água**, quando se detectou um aumento em torno de 6,7% entre S1 e S2 ($p=0,017$). Independente da semana, a menor porcentagem foi observada no grupo S, quando comparado aos grupos N ($p=0,007$) e M ($p=0,035$). Desta forma, verificou-se que o grupo S é 17% e 12% menor do que os grupos N e M, respectivamente (Gráfico 2G).

Foi possível observar um aumento significativo na quantidade de **excreção de fezes** de S1 para S2, nos grupos N (72%) e M (82%), $p<0,05$. Considerando-se os períodos separadamente, em S1, a excreção dos grupos M e S foram, respectivamente, 32% e 88% menores do que o grupo N; em S2, 29% e 80%, $p<0,05$ (Gráfico 2H).

Quanto a **razão excreção de fezes/ingestão alimentar** somente o grupo S exibiu um aumento significativo (5,8%) de S1 para S2, $p < 0,05$. Em S1, o grupo S apresentou menor razão do que os grupos N (5,3%) e M (7,2%), $p < 0,05$; em S2, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos N, M e S (Gráfico 2I).

Gráfico 2 - Representação gráfica da média e desvio padrão da Massa Corporal (g), Ingestão Alimentar (g), Razão Ingestão Alimentar/Massa Corporal (%), Ingestão de Água (g), Razão Ingestão de Água/Massa Corporal (%), Excreção de Urina (g), Razão Excreção de Urina/Ingestão de Água (%), Excreção de Fezes (g), Razão Excreção de Fezes/Ingestão Alimentar (%) dos animais dos grupos N, M e S, submetidos às gaiolas metabólicas nas semanas S1 e S2

Fonte: (RIBEIRO, L., 2015)

Legenda: **(A)** Massa Corporal (g). Em S1 e S2 os grupos apresentaram diferenças significantes entre si, $p < 0,05$. Os grupos N, M e S apresentaram aumento significativo na massa corporal de S1 para S2 dias, $p < 0,05$. **(B)** Ingestão Alimentar (g). Em S1 e S2 os grupos apresentaram diferenças significantes entre si, $p < 0,05$. Apenas os grupos N e M apresentaram aumento significativo na Ingestão Alimentar de S1 para S2, $p < 0,05$. **(C)** Razão Ingestão Alimentar/Massa Corporal (%). Independente da semana, os grupos M e S apresentaram maior razão ingestão alimentar por massa corporal quando comparados ao grupo N, $p < 0,001$ e $p = 0,009$ respectivamente. Independente do grupo, houve diminuição significativa na razão de S1 para S2, $p = 0,025$. **(D)** Ingestão de Água (g). Houve aumento significativo na ingestão de água em S1 para S2 nos grupos N e M, $p < 0,05$. Em S1 apenas o grupo S apresentou menor ingestão de água quando comparado ao grupo N. Em S2, o grupo S apresentou menor ingestão de água do que os grupos N e M, $p < 0,05$. Os grupos M e N não apresentaram diferença significativa em S1 e S2. **(E)** Razão Ingestão de Água/Massa Corporal (%). Independente do grupo, não houve aumento significativo na razão ingestão de água por massa corporal em S1 para S2, $p = 0,066$. Independente da semana, os grupos M e S apresentaram maior porcentagem de ingestão de água por massa corporal do que o grupo N, $p = 0,002$ e $p = 0,018$ respectivamente. **(F)** Excreção de Urina (g). Independente do grupo, houve aumento significativo na excreção de urina em S1 para S2, $p < 0,001$. Independente da semana, o grupo S apresentou menor excreção de urina do que os grupos N e M, $p < 0,001$. **(G)** Razão Excreção de Urina/Ingestão de Água (%). Independente do grupo houve aumento significativo na razão excreção de urina por ingestão de água (%) em S1 para S2, $p = 0,017$. Independente da semana, o grupo S apresentou menor razão do que os grupos N e M, $p = 0,007$ e $p = 0,035$, respectivamente. **(H)** Excreção de Fezes (g). Nos grupos N e M houve aumento significativo na excreção de fezes em S1 para S2, $p < 0,05$. Tanto em S1 como em S2, o grupo N apresentou maior excreção de fezes, seguido pelos grupos M e o grupo S apresentou a menor excreção de fezes, $p < 0,05$. **(I)** Razão excreção de Fezes/Ingestão Alimentar (%). No grupo S houve aumento significativo na razão excreção de fezes por ingestão alimentar em S1 para S2, $p < 0,05$. Em S1, o grupo S apresentou menor razão excreção de fezes por ingestão alimentar do que os grupos N e M, $p < 0,05$.

5.3.3 Análise Morfométrica

Na tabela 4 estão expressas em mm² as médias ($\pm$ DP) das áreas **ventricular total** (AV), **externa do ventrículo esquerdo** (AEVE), e **interna do ventrículo esquerdo** (AIVE) e, em mm, a **espessura das paredes do ventrículo esquerdo** (EVE).

Tabela 4 - Morfometria do Ventrículo Esquerdo (VE) dos animais dos grupos N, M e S, com 21 e 42 dias

		N	M	S
AV ¹ (mm ²)	21d	58,6 $\pm$ 2,2	35,1 $\pm$ 5,7	22,1 $\pm$ 0,8
	42d	78,1 $\pm$ 10,3	43,0 $\pm$ 5,5	26,9 $\pm$ 1,6
AEVE ² (mm ²)	21d	41,1 $\pm$ 3,5	24,4 $\pm$ 3,5	15,6 $\pm$ 0,6
	42d	54,2 $\pm$ 6,5	29,1 $\pm$ 4,1	20,3 $\pm$ 1,9
AIVE ³ (mm ²)	21d	9,3 $\pm$ 2,6	3,3 $\pm$ 1,6	3,1 $\pm$ 0,9
	42d	6,3 $\pm$ 2,8	2,5 $\pm$ 0,7	2,9 $\pm$ 1,1
AEVE/AV ⁴ (%)	21d	70,1 $\pm$ 4,1	69,6 $\pm$ 1,6	70,7 $\pm$ 1,8
	42d	69,5 $\pm$ 1,9	67,5 $\pm$ 4,3	75,5 $\pm$ 4,1
AIVE/AV ⁵ (%)	21d	15,7 $\pm$ 4,1	8,9 $\pm$ 3,1	13,9 $\pm$ 4,1
	42d	7,8 $\pm$ 2,5	5,9 $\pm$ 1,3	11,0 $\pm$ 3,9
AIVE/AEVE ⁶ (%)	21d	22,5 $\pm$ 5,7	12,9 $\pm$ 4,7	19,6 $\pm$ 5,5
	42d	11,3 $\pm$ 3,7	8,7 $\pm$ 2,0	14,4 $\pm$ 4,6
EVE ⁷ (mm)	21d	1,9 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1
	42d	2,6 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,2

Fonte: (RIBEIRO L, 2015)

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. N, M e S (n=5).

¹⁻⁷ANOVA dois fatores.

¹Grupo x Idade, p=0,623; Grupo, p<0,001 (Tukey, M $\neq$ N, S $\neq$ N, S $\neq$ M, p<0,05, independente da Idade); Idade, p<0,001 (42d $\neq$ 21d, independente do Grupo). ²Grupo x Idade, p=0,583; Grupo, p<0,001 (Tukey, M $\neq$ N, S $\neq$ N, S $\neq$ M, p<0,05, independente da Idade); Idade, p<0,001 (42d $\neq$ 21d, independente do Grupo). ³Grupo x Idade, p=0,197; Grupo, p<0,001 (Tukey, M $\neq$ N, S $\neq$ N, p<0,05, independente da Idade); Idade, p=0,062. ⁴Grupo x Idade, p=0,056; Grupo, p=0,011 (Tukey, S $\neq$ M, p<0,05, independente da Idade); Idade, p=0,509. ⁵Grupo x Idade, p=0,210; Grupo, p=0,003 (Tukey, M $\neq$ N, S $\neq$ M, p<0,05, independente da Idade); Idade, p=0,001 (42d $\neq$ 21d, independente do Grupo). ⁶Grupo x Idade, p=0,237; Grupo, p=0,001 (Tukey, M $\neq$ N, S $\neq$ M, p<0,05, independente da Idade); Idade, p<0,001 (42d $\neq$ 21d, independente do Grupo). ⁷Grupo x Idade, p=0,074; Grupo, p<0,001 (Tukey, M $\neq$ N, S $\neq$ N, S $\neq$ M, p<0,05, independente da Idade); Idade, p<0,001 (42d $\neq$ 21d, independente do Grupo).

Quanto à **AV**, independentemente do fator idade, o maior valor foi observado no grupo N, e o menor, no grupo S, p<0,05. De 21 para 42 dias, os três grupos apresentaram aumento significativo, p<0,001. Com 21 dias, em relação ao grupo N, o grupo M foi 40% menor, e o grupo S, 62%. No período de 42 dias, ainda em relação ao grupo N, o grupo M foi 45% menor e o grupo S 66%. Entre os períodos, isto é, de 21 para 42 dias, o aumento foi de 33% para o grupo N, e de 22% para os grupos M e S (Gráfico 3A).

Independentemente da idade, a maior e a menor **AEVE** também foram observadas, respectivamente, nos grupos N e S, p<0,05. Os três grupos apresentaram aumento significativo

desse parâmetro de 21 para 42 dias ($p<0,001$), ou seja, 32%, para o grupo N, 19% para o grupo M, e 30% para o grupo S. Ao se considerar o período de 21 dias, e o grupo N como controle, a área foi 41% menor no grupo M, e 62% no grupo S; com 42 dias, foi 46% e 63%, respectivamente, menor em relação a N (Gráfico 3B).

Para o parâmetro **AIVE**, independentemente da idade, o grupo N apresentou o maior valor e os grupos S e M não apresentaram diferença significativa entre si ($p<0,05$). Em relação a N, a área dos grupos M e S foi aproximadamente 62% menor. Não foi detectada diferença significativa entre 21 e 42 dias, $p=0,062$. (Gráfico 3C).

Para a **razão da AEVE/AV**, apenas o grupo S apresentou maior razão do que M, $p<0,05$, independentemente da idade. Não foi detectada diferença significativa entre 21 e 42 dias, $p=0,509$ (Gráfico 3D).

Independentemente da idade, o grupo M apresentou a menor razão da **AIVE/AV** do que os grupos N e S, que não exibiram diferença significativa entre si, $p<0,05$. De 21 para 42 dias a diminuição verificada foi significativa, independente do grupo. No grupo N foi de 8%, e a dos grupos M e S, de 3% (Gráfico 3E).

Também para a **razão AIVE/AEVE**, independentemente da idade, os menores valores foram verificados para o grupo M comparativamente aos grupos N e S, que não exibiram diferenças significantes entre si, $p<0,05$. Uma diminuição significativa foi detectada nessa razão, independente do grupo, do período de 21 para o de 42 dias, $p<0,05$ (N 11,2%; M 4,2%; S 5,2%) (Gráfico 3F).

Ao analisar o parâmetro de **EVE**, houve diferença significativa entre os grupos, independente da idade, com o grupo N apresentando a maior espessura, e o grupo S, a menor ($p<0,05$). De 21 para 42 dias, ocorreu um aumento desse parâmetro nos três grupos, destacando-se, N 37%, M 17% e S 31%, $p<0,001$ (Gráfico 3G).

Gráfico 3 - Representação gráfica da média e desvio padrão, da AV (mm^2), AEVE (mm^2), AIVE (mm^2), Razão AEVE/AV (%), Razão AIVE/AV (%), Razão AIVE/AEVE (%) e EVE (mm)

Fonte: (RIBEIRO L.,2015)

Legenda: (A) AV (mm^2). Os grupos apresentaram diferenças significantes entre si, $p < 0,05$. Foi significativo o aumento de AV de 21 para 42 dias, $p < 0,001$. (B) AEVE (mm^2). Os grupos apresentaram diferenças significantes entre si, $p < 0,05$. Foi significativo o aumento de AEVE de 21 para 42 dias, $p < 0,001$. (C) AIVE (mm^2). O grupo N apresentou maior área, $p < 0,05$, enquanto que S e M não apresentaram diferença significativa entre si, independentemente da idade. Não foi detectada diferença significativa entre 21 e 42 dias, $p = 0,062$. (D) Razão AEVE/AV (%). O grupo S apresentou maior razão do que M, $p < 0,05$, independentemente da idade. Não foi detectada diferença significativa entre 21 e 42 dias, $p = 0,509$. (E) Razão AIVE/AV (%). O grupo M apresentou menor razão da AIVE por AV do que os grupos N e S, independentemente da idade, $p < 0,05$. Houve diminuição da razão AIVE por AV de 21 para 42 dias, independentemente do Grupo, $p = 0,001$. (F) Razão AIVE/AEVE (%). O mesmo observa-se para a razão AIVE por AEVE, onde o grupo M, independentemente da idade, obteve valores menores comparados aos grupos, N e S, $p < 0,05$. Houve diminuição da razão AIVE por AEVE de 21 para 42 dias, independentemente do Grupo, $p < 0,001$. (G) EVE (mm). Houve diferença significativa entre os grupos, independentemente da idade, o grupo N apresentou maior espessura enquanto que S apresentou a menor espessura, $p < 0,05$. Houve aumento significativo de EVE de 21 para 42 dias, $p < 0,001$.

5.3.4 Análise Estereológica

Na Tabela 5 estão expressas, em porcentagem, **densidade de volume de núcleos de cardiomiócitos** (V_v) (%), bem como a **espessura dos cardiomiócitos** (μm).

Tabela 5 - Densidade de volume de núcleos de cardiomiócitos V_v (%) e espessura dos cardiomiócitos (μm) dos animais dos grupos N, M e S, com 21 e 42 dias de vida

		N	M	S
V_v^1 (%)	21d	$29,4 \pm 3,9$	$24,6 \pm 3,6$	$41,2 \pm 5,7^{* \#}$
	42d	$12,7 \pm 1,6^{\$}$	$15,5 \pm 1,4^{\$}$	$22,2 \pm 2,1^{* \# \$}$
Espessura ² (μm)	21d	$10,02 \pm 0,5$	$8,82 \pm 0,8$	$8,24 \pm 0,4$
	42d	$10,95 \pm 0,3$	$10,86 \pm 0,7$	$10,47 \pm 1,1$

Fonte: (RIBEIRO L, 2015)

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. n=5

¹⁻²ANOVA dois fatores.

¹Grupo x Idade, $p=0,013$. ²Grupo x Idade, $p=0,104$; Grupo, $p=0,005$ (Tukey, $S \neq N$, $p<0,05$, independentemente da Idade); Idade, $p<0,001$ ($42d \neq 21d$, independente do Grupo).

* $\neq N$, # $\neq M$, \$ $\neq S$, (Tukey, $p<0,05$)

Relativamente à idade, todos os grupos apresentaram diminuição de V_v de 21 para 42 dias, (N - 17%; M - 9%, e S - 19%). Independente da idade, o V_v foi maior no grupo S, em comparação aos grupos N (12% e 10%) e M (17% e 7%), em 21 e 42 dias respectivamente, $p<0,05$ (Gráfico 4A).

Independentemente do grupo, houve aumento significativo na **espessura dos cardiomiócito** de 21 para 42 dias, $p<0,001$ (N- 9%, M- 23% e S- 27%). Apenas o grupo S apresentou menor espessura do que o grupo N, independentemente da idade, $p<0,05$. Em 21 dias o grupo S apresentou-se 18% menor e em 42 dias 4,4% (Gráfico 4B).

Gráfico 4 - Representação gráfica da média e desvio padrão da Vv (%) e Espessura dos cardiomiócitos (μm) dos animais dos grupos N, M e S, com 21 e 42 dias

Fonte: (RIBEIRO L, 2015)

Legenda: **(A)** Vv (%). O grupo S apresentou diferença significativa de N e M, em 21 e 42 dias, $p < 0,05$. Os grupos apresentaram diminuição de Vv de 21 para 42 dias, $p < 0,05$. **(B)** Espessura dos cardiomiócitos (μm). O grupo S apresentou menor espessura dos cardiomiócitos do que N, independentemente da idade, $p < 0,05$. Houve aumento significativo da espessura dos cardiomiócitos de 21 dias para 42 dias, independentemente do grupo, $p < 0,001$.

A distribuição de frequência da espessura do cardiomiócito (%) está expressa no gráfico 5. Desta forma, verifica-se que aos 21 dias, a maior concentração para os grupos N, S e M foi encontrada nos intervalos de $8-11\mu\text{m}$ (66%), $7-9\mu\text{m}$ (68%), e $7-10\mu\text{m}$ (65%), respectivamente. Enquanto que na idade de 42 dias a maior concentração tenha ocorrido no intervalo de $9-12\mu\text{m}$ (57%) para N, $8-11\mu\text{m}$ (55%) para S e $9-12\mu\text{m}$ (58%) para M.

Gráfico 5 - Representação gráfica da distribuição de frequência (%) da espesura dos cardiomiócitos (μm) dos animais dos grupos N, M e S, com 21 e 42 dias

Fonte: (RIBEIRO L, 2015)

Legenda: **(A)** Distribuição de frequência (%) da espesura dos cardiomiócitos em intervalos de $1\mu\text{m}$ dos animais N, M e S de 21 dias. **(B)** Distribuição de frequência (%) da espesura dos cardiomiócitos em intervalos de $1\mu\text{m}$ dos animais N, M e S de 42 dias.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Neste capítulo serão discutidos os resultados obtidos relacionados aos aspectos metabólicos, morfológicos, macroscópicos e microscópicos.

6.1 PARÂMETROS FÍSICOS E COMPORTAMENTAIS GERAIS

Considerando-se que a quantidade e a qualidade do leite materno influencia a oferta proteica para a prole (MARIN et al., 1995), observou-se na presente pesquisa, um atraso no desenvolvimento no processo de locomoção dos animais subnutridos durante a fase de amamentação, corroborando com a teoria de que quando reduz-se a quantidade de proteína necessária ao o processo de catabolismo, haverá uma consequente deficiência de aminoácidos disponíveis, impossibilitando que sejam formadas proteínas importantes para o desenvolvimento e maturidade adequados dos ossos e dos músculos (BOLINA-MATOS, 2012).

As diferenças comportamentais da progenitora e da prole favoreceu o canibalismo da mãe em relação aos filhotes. Esta conduta foi descrita por Castilho (1975) como estando associada ao estresse causado pela escassez proteica aliada a situações que podem ocasionar respostas fisiológicas adversas no animal. Desta forma, muito embora tenha se tentado minimizar cuidadosamente os efeitos determinados por alterações relativas à mudança de trocador, manejo, isolamento, métodos experimentais e barulho excessivo (ANDRADE et al., 2002), não foi possível no presente estudo eliminar o estresse que a escassez protéica promoveu, fato que pode explicar a maior frequência de canibalismo no grupo S.

Além das diferenças físicas gerais como o comprimento dos animais perceptíveis nos grupos S e M em comparação ao grupo N, a menor densidade numérica de pelos com tamanhos menores principalmente no grupo S estão de acordo com as descrições histológicas de Shrader e Zeman, (1969), que atribuem essas características à reatividade enzimática reduzida nas camadas da epiderme, nas células epiteliais dos brotos rudimentares do pelo, na composição do tecido conjuntivo e nas papilas em formação de animais desnutridos.

6.2 PARÂMETROS METABÓLICOS

No tecido cardíaco, advém uma diminuição significativa da distância máxima de difusão dos metabólicos, aprimorando o abastecimento energético celular e apresentando uma relativa proteção no metabolismo em miócitos desnutridos (VANDEWOUDE, 1995).

Na presente pesquisa, os parâmetros metabólicos analisados (ingestão alimentar e de água, e excreção de fezes e urina) foram maiores no grupo N, e menores no grupo S; os grupos M exibiram resultados intermediários. Segundo Sawaya, (2003), em animais subnutridos, como é o caso do grupo S, a ingestão de alimentos é reduzida em decorrência da má absorção dos mesmos. Estudos que avaliam a subnutrição desde a gestação e a lactação, podem induzir graves alterações metabólicas (HOWIE et al., 2012), além de causar efeitos nocivos, ou até mesmo, irreversíveis (OLIVEIRA et al., 2010).

Ao se avaliar a razão ingestão alimentar/massa corporal verificou-se que os grupos S e M ingeriram uma maior quantidade de ração, proporcionalmente à massa corporal. Para Savino et al (2007), os mecanismos do apetite são controlados por alterações de eixos hormonais que relacionam-se com o hipotálamo e a hipófise. O hormônio da saciedade, a leptina, é secretado pelos adipócitos no organismo, onde sinalizam ao hipotálamo, e envia sinais aos receptores de neurônios em resposta à restrição ou ingestão de alimentos. Sendo assim, a leptina favorece a regulação da quantidade de energia armazenada e/ou da ingestão alimentar. Por outro lado, o hormônio da fome, a grelina, age estimulando o apetite (SHARMA et al., 2013). A perda da massa corporal, acompanhada à subnutrição, aumentam os níveis de grelina, que, aumenta a ingestão alimentar (RIEDL et al., 2012).

Quando analisada a razão excreção de urina/ingestão de água, a menor porcentagem foi observada no grupo S, quando comparado aos grupos N e M, mostrando que os animais subnutridos apresentaram retenção hídrica nos tecidos, provavelmente pelo baixo nível protéico. Esse fato pode ser comprovado com os efeitos provenientes de uma subnutrição severa (Kwashiorkor), onde um dos principais sinais clínicos é a presença de edema (TIERNEY; SAGE; SHWAYDER, 2010).

Quanto à razão excreção de fezes/ingestão alimentar, apesar de não apresentar diferença entre os grupos, pode observar que houve tendência ao aumento das médias no grupo S. Esses dados indicam que os animais, subnutridos desde a gestação e lactação, demonstraram uma necessidade de se alimentar, com o intuito de suprir a carência protéica, devido à má adaptação e absorção do alimento pelo trato gastrointestinal (BOLINA, 2014).

6.3 ANÁLISE QUALITATIVA

Quanto à análise morfológica dos ventrículos, observou-se que, quando comparados os grupos de 21 com os de 42 dias, o contorno ventricular do grupo N praticamente dobrou, e o desenvolvimento no grupo S foi pouco aparente. Nos animais do grupo M, esse parâmetro exibiu um discreto aumento. Essas observações demonstram que a deficiência no crescimento, determinada pela depleção na dieta torna-se dependente da idade e da capacidade de recuperação do organismo, como descrito por Winick e Noble, (1966). Para ele, como a desnutrição inicial incide na divisão celular e o animal não pode retomar essa etapa, isto repercute num estágio mais avançado do crescimento, onde se evidencia uma redução no tamanho das células. Desta forma, pelo menos com o protocolo aqui empregado relativamente aos períodos de vida do animal, tanto a dieta hipoprotéica como a padrão de Moçambique incidiram também sobre o desenvolvimento do órgão.

A principal função mecânica do tecido conjuntivo é a de fornecer suporte para a manutenção do alinhamento dos cardiomiócitos. Devido a sua tensão a distensão e elasticidade, ele resiste à deformação, preservando a forma e a espessura, prevenindo rupturas e contribuindo para o enrijecimento passivo e ativo do miocárdio. (MARTOS et al., 2007). De acordo com Cicogna et al. (1999) no interstício do miocárdio encontram-se, além das fibras colágenas dos tipos I (80%) e III (12%), as dos tipos IV, V e VI, com a função de suportar também os vasos intramiocárdicos, além de participar na defesa contra invasões por corpos estranhos, e auxiliar na nutrição dos miócitos.

A densidade e distribuição das fibras colágenas dos tipos I e III nos animais de 42 dias (N42, S42 e M42), diferentes da observada nos animais mais jovens (N21, S21 e M21), são compatíveis com o aumento do colágeno intersticial descrito por Cicogna et al. (1999) no coração de ratos desnutridos adultos. A menor densidade aparente dessas fibras observada nos animais do grupo N pode indicar uma fase de remodelação já estabelecida, enquanto que o predomínio das fibras do tipo III nos grupos S e M, esse processo encontra-se em franco andamento.

As fibras elásticas, em grande quantidade nas paredes das artérias, promovendo a resistência necessária à sua distensão (WEBER, 1989; LOPES et al., 2002) não foram detectadas no miocárdio de todos os grupos estudados, pelo menos com a metodologia empregada. Uma vez que a densidade desse tipo de fibra é elevadíssima em casos de patologias do miocárdio, como tumores cardíacos (PERNICK, 2013), a não evidênciação das

mesmas principalmente nos grupos S e M permitem inferir que, pelo menos na fase em que se encontram os animais, o estado de subnutrição não alterou a estrutura normal do arcabouço do miocárdio.

Ultraestruturalmente, porém, os cardiomiócitos do grupo S21 com linha Z irregular e densidade clara e mantida no grupo S42, contrastando com a linha Z bem definida e com densidade escura dos grupos N21 e M21, e N42 e M42, evidenciam um efeito da subnutrição que ainda não se pode associar com uma disfunção miofibrilar permanente, muito embora observações semelhantes tenham sido feitas por Sugizaki et al. (2005). Esses autores, usando um modelo de restrição alimentar da ordem de 50%, verificaram alterações ultraestruturais em cardiomiócitos de ratos, tais como a ausência ou desorganização dos miofilamentos e da linha Z, mitocôndrias polimórficas com cristas desorganizadas e uma grande quantidade de fibras colágenas intersticiais nos ratos desnutridos. Muito embora não se tenha avaliado o aspecto das mitocôndrias, sabe-se que uma das características das mesmas na desnutrição é a desorganização das suas cristas. Assim, é plausível admitir que as alterações ultraestruturais aqui descritas, estão relacionadas a um processo de atraso no desenvolvimento dessas células, e não com um processo de degeneração. Estudos com animais submetidos a uma dieta hipoprotéica com tempo superior ao aqui empregado podem elucidar definitivamente essa questão, ainda em aberto.

Também, se torna necessário uma avaliação na densidade das mitocôndrias nos cardiomiócitos, uma vez que uma elevação nesse parâmetro em cardiomiócitos ventriculares de animais submetidos à restrição protéica observada por Johnson et al. (2009), poderia estar associada com um aumento na produção de energia para compensar ou minimizar a deficiência na mecânica de células induzidas por disfunção miofibrilar.

6.4 ANÁLISE QUANTITATIVA

A alimentação utilizando-se dietas com baixo teor proteico na gestação geram animais com perturbações no crescimento fetal e no peso ao nascer. As características do baixo peso e das desproporções corporais resultantes da subnutrição são fortes identificadores de risco elevado para o desenvolvimento de doenças na vida adulta (LANGLEY-EVANS, 2001).

Baseando-se nessas considerações, particularmente o reduzido peso corporal ao nascer dos animais do grupo S (34% menor do que o do grupo N), a manutenção de um patamar baixo relativo aos animais nutridos, tanto dos animais S como M nos períodos estudados (21 e 42 dias), e a não recuperação do comprimento naso-anal desses animais, são indicativos de um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares nesses animais (BARKER, 1995). Assim, fica evidente que não somente os animais subnutridos devem ser submetidos a um processo de renutrição, mas também aqueles mantidos com a dieta padrão de Moçambique que, por ser fornecida à população de um País, merece especial atenção quanto a esse processo.

Quanto ao coração, vários estudos analisaram a existência de atrofia cardíaca com redução do peso do órgão, tanto na desnutrição experimental (NUTTER et al., 1979; SAMAREL et al., 1987; DESAI et al., 1996; ASADIFAR et al., 2005; TOSCANO et al., 2008), quanto em seres humanos (SUTTON et al., 1985; BERGMAN et al., 1988, KOTHARI et al., 1992; SARAIVA; BRINDEIRO FILHO; NORA, 1992; EL-SAYED et al., 2006).

O menor peso do coração dos grupos S e M em relação ao grupo N, corroboram com as pesquisas sobre o prejuízo no crescimento de órgãos frente à carência de substratos adequados para manter a síntese proteica, que conduz à uma atrofia tecidual generalizada (BERGMAN et al., 1988; TOSCANO et al., 2008). Essas alterações que para Samarel et al. (1987) seriam provavelmente responsáveis pela diminuição ou atrofia permanente do coração no estado de desnutrição, talvez não sejam permanentes, caso se estabeleçam processos de recuperação protéica, em fases onde ainda se pode intervir na dinâmica de crescimento dos órgãos em geral, particularmente o coração.

Em ratos, desnutridos, Desai et al. (1996) encontraram menor relação peso cardíaco/peso corporal; ratos submetidos à restrição de 50% na dieta, exibiram perda de peso desproporcional e aumento da relação peso corpóreo/ventrículo, sem contudo exibirem alterações na mecânica cardíaca (CICOGNA et al., 2000). Nos estudos de Saraiva (1990) e Toscano et al. (2008), foi caracterizada maior redução do peso corporal em comparação ao

peso do coração, sugerindo que a adaptação do órgão às necessidades do corpo ocorre com certa restrição. Previamente, autores como Zeman (1967) já havia sinalizado que a restrição proteica materna em ratos jovens promove o aumento de peso cardíaco, cerebral e tímico em relação ao peso corpóreo total.

Assim, pode-se considerar que, além dos animais do grupo S, onde os resultados sobre peso do coração/peso corporal confirmam os autores acima descritos, chama à atenção os dados para o grupo M, que, embora de valor intermediário entre N e S, também foi diferente quando comparado ao grupo N.

Em diferentes níveis no miocárdio estudos morfométricos realizados mostram modificações como a microvascularização e mecanismo de adaptação dos cardiomiócitos desnutridos, proporcionando mudanças nos tecidos que resultam em alterações quantitativas e qualitativas na composição celular e subcelular (VANDEWOUDE, 1995). Segundo Fioretto et al (2002), na avaliação morfométrica, função e características bioquímicas do coração, a desnutrição favorece a atrofia e retardo do crescimento cardíaco, relacionando seus resultados à diminuição de síntese de componentes miofibrilares e aumento do catabolismo das proteínas.

Dentre os parâmetros observados na presente pesquisa, as medidas que esboçam a área ocupada pela musculatura da câmara cardíaca demonstram que as mesmas foram menores nos grupos S e M, em relação aos grupos N. Desta forma, Sutton (1995) cita que a desnutrição levaria à redução no diâmetro da cavidade do VE em decorrência da redução da massa do miocárdio. A redução da área ocupada pelo VE nos grupos S e M da ordem de 62%, e também a diminuição da EVE em S e M, principalmente na idade de 42 dias, são compatíveis com o descrito em crianças com desnutrição calórico-proteica grave tipo kwashiorkor, onde há uma diminuição do volume cardíaco, e da espessura da parede do ventrículo esquerdo (SARAIVA, 1990).

Quanto a esses parâmetros, verifica-se na literatura consultada divergências entre os autores. Bergman (1988) e Fioretto et al. (2002) descreveram um aumento da geometria da cavidade do VE pelo remodelamento do miocárdio, enquanto que Cheema et al. (2005) verificaram um aumento na espessura da parede do VE de ratos submetidos à desnutrição proteica (caseína 9%), sugerindo hipertrofia ventricular patológica decorrente de disfunção cardíaca, e De Castro Magalhães et al. (2008) descrevem que uma hipertrofia ventricular esquerda do tipo concêntrica caracterizada pelo aumento da espessura da parede do VE, e redução de seu diâmetro cavitários.

Tem sido comprovado experimentalmente que a desnutrição é um fator inibidor do metabolismo celular cardíaco, o que pode ser notado com maior intensidade quando ela atua durante os períodos críticos de proliferação e maturação celular na vida fetal e pós-natal precoce (DESAI et al., 1996; TAPPIA et al., 2005; BUBB et al., 2007). O aumento da densidade média de cardiomiócitos ocorre a partir de conceitos de adaptação bioquímica e de composição cardíaca que propõem à preservação da função cardíaca. Corstius et al. (2005) também ressaltam que no início da vida fetal, o crescimento fisiológico dos cardiomiócitos é principalmente hiperplástico, porém, quando essas células amadurecem no período pré-natal tardio e no pós-natal precoce, ocorre predomínio da hipertrofia celular. Enfatizando tais considerações, Kothari et al. (1992) concluem que a preservação cardíaca incide em pacientes com desnutrição proteica energética severa, permanecendo manutenção das funções sistólicas nos corações atrofizados desnutridos.

Esses danos, além de expressos na redução do número de cardiomiócitos, também diminuem a área de secção transversa das células cardíacas, determinam apoptose, necrose, infiltração de células inflamatórias, processo cicatricial, diminuição dos núcleos das células e picnose (FIORETTO et al., 2002; TOSCANO et al., 2008). Fundamentando-se nesses conceitos, a diminuição na espessura dos cardiomiócitos nos grupos S quando comparados com o grupo N, sugerem uma hipotrofia dessas células devido à desnutrição imposta. Dados semelhantes demonstrados novamente por Fioretto et al. (2002) confirmam essas afirmações.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia aplicada no presente estudo e os resultados obtidos acerca das repercussões morfológicas causadas pela subnutrição proteica no miocárdio, pode-se concluir que:

1. Os animais dos grupos subnutridos (S21 e S42) e os grupos que receberam a dieta padrão de Moçambique (M21 e M42) exibiram características físicas, massa corporal e parâmetros metabólicos reduzidos em relação aos respectivos grupos nutridos (N21 e N42);
2. As fibras colágenas dos grupos N podem indicar fase de remodelação, enquanto que nos grupos S e M, o predomínio do tipo III demonstram fase em andamento desses animais;
- 3 Os componentes celulares ultraestruturais do miocárdio revelam alterações em decorrência dos efeitos da subnutrição, essa relação está no processo de atraso no desenvolvimento celular,
- 4 A desnutrição favoreceu a atrofia cardíaca nos animais submetidos à dieta hipoprotéica e a dieta padrão de Moçambique, sendo responsável pela redução no diâmetro da cavidade do VE, redução da massa miocárdica e também redução do número de cardiomiócitos em relação aos animais nutrido.

Desta forma, pode-se afirmar que o modelo de restrição proteica pré e pós-natal imposta aos animais durante os períodos de 21 e 42 dias, foi suficiente para verificar alterações morfológicas, e que a subnutrição afeta o desenvolvimento do miocárdio e ainda desenvolve mecanismos compensatórios para minimizar estes prejuízos. Sendo assim, diante de todos os resultados e das proposições realizadas, não se descarta a hipótese de que a subnutrição proteica, em determinados períodos, seja responsável por alterações irreversíveis no miocárdio de ratos Wistar.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

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. *Jornal de Pediatria*, v. 84, p. 264-271, 2008.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório, criação e experimentação**. 2002, Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz.

ANUMOD, S.; APARNA, S. V.; GGAYATHRI DEVI, A. S.; JULIE, I. S.; FERRY, L.; SANTHAN, S.; HEPSIBAI, J. Malnutrition among under five children and factors influencing it. **International Journal of Nursing Education**, v. 6, n. 1, p. 135-139, 2014.

ARAUJO, E. M. Efeito do exercício físico moderado sobre os grânulos do fator natriurético atrial nos cardiomiócitos da aurícula direita de ratos de meia idade: análise morfométrica, estereológica e ultra estrutural. 2007, 16 f. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Educação Física), Universidade São Judas Tadeu, São Paulo, 2007.

ASADIFAR, M.; YAZDANI, M.; SADEGHPOUR, R.; BRUNO, C.; GREEN, J.; NAKAMOTO, A. T.; NAKAMOTO, T. Combined effects of caffeine and malnutrition on the newborn rat's myocardium. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 451-456, 2005.

BARKER, D. J. The fetal origins of hypertension. **Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension**, v. 14, n. 5, p. 117-120, 1996.

BARKER, D. J. P. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ: British Medical Journal**, London, v. 311, p. 171-171, 1995.

BARKER, D. J.; GLUCKMAN, P. D.; GODFREY, K. M.; HARDING, J. E.; OWENS, J. A., ROBINSON, J. S. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **The Lancet**, v. 341, p. 938-941, 1993.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 1975, São Paulo: Edusp, p. 241.

BERGMAN, J. W.; HUMAN, D. G.; DE MOOR, M. M.; SCHULZ, J. M. Effect of kwashiorkor on the cardiovascular system. **Archives of disease in childhood**, v. 63, n. 11, p. 1359-1362, 1988.

BLACK, R. E.; ALLEN, L. H.; BHUTTA, Z. A.; CAULFIELD, L. E.; DE ONIS, M.; EZZATI, M.; MATHERS, C.; RIVERA, J. Maternal and child undernutrition study group, maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **The Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 243-260, 2008.

BLACK, R. E.; VICTORIA C. G.; WALKER S. P.; BHUTTA Z. A.; CHRISTIAN P. De Onis, M. Maternal and child nutrition study group. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **The Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 427-451, 2013.

BOLINA, C. S. **Efeitos da recuperação proteica pós-natal com suplementação de resveratrol na cartilagem articular da articulação do joelho de ratos Wistar subnutridos**. 2014. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

BOLINA-MATOS, R. S. **Aspectos histoquímicos e quantitativos da renutrição precoce e tardia no córtex cerebral de ratos Wistar**. 2012. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BORBA, J. M. C.; ARAÚJO, M. S.; PICANÇO-DINIZ, C. W.; MAHÃES-DE-CASTRO, R.; GUEDES, R. C. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. **Brain Research Bulletin**, Phoenix, v. 53, n. 2, p. 193-201, 2000.

BRASEL, J. A.; GRUEN, R. K. **Cellular growth: brain, liver, muscle, and lung**. Human growth. New York, USA: Springer US, 1978, Cap. 1, v. 2, p. 3-19.

BRUULSEMA, T.; WHEFFER, P.; WELCH, R. M.; CAKMAK, I.; MORAN, K. **Fertilizing crops to improve human health: a scientific review**. [S.l.]: International Plant Nutrition Institute, 2012.

BUBB, K. J.; COCK, M. L.; BLACK, M. J.; DODIC, M.; BOON, W. M.; PARKINGTON, H. C.; TARE, M. Intrauterine growth restriction delays cardiomyocyte maturation and alters coronary artery function in the fetal sheep. **The Journal of Physiology**, v. 578, n. 3, p. 871-881, 2007.

CARIAS, D.; CIOCCIA, A. M.; HEVIA, P. Grado de concordancia entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas in vivo e in vitro y su efecto sobre el cómputo químico. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 45, n. 2, p. 111-116, 1995.

CARTMELL, E.; NATALAL, H.; FRANÇOIS, I.; FERREIRA, M. H.; GRAHNQUIST, L. Nutritional and clinical status of children admitted to the malnutrition ward, Maputo central hospital: a comparison of data from 2001 and 1983. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 51, n. 2, p. 102-105, 2005.

CASTILLO, E. D. Consideraciones sobre desnutrición materna y desnutrición in útero. **Ginecología e Obstetrícia Médica**, v. 37, p. 103-18, 1975.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system from birth to old age. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 3, p. 73-76, 2002.

CHEEMA, K. K.; DENT, M. R.; SAINI, H. K.; AROUTIOUNOVA, N.; TAPPIA, P. S. Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 4, p. 471-477, 2005.

CICOGNA, A. C.; PADOVANI, C. R.; GEORGETTE, J. C. ARAGON, F. F.; OKOSHI, M. P. Efeito da restrição proteica-calórica sobre a função mecânica dos músculos cardíacos hipertrofiados. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 72, p. 431-435, 1999.

CICOGNA, A. C.; OKOSHI, M. P.; OKOSHI, K. Natural evolution of the myocardial remodeling: from injury to symptoms. **Revista da Sociedade de Cardiologia**. São Paulo, v. 10, p. 8-16, 2000.

CORSTIUS, H. B.; ZIMANYI, M. A.; MAKU, N.; HERATH, T.; THOMAS, W.; VAN DER LAARSE, A.; BLACK, M. J. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. **Pediatric Research**, v. 57, n. 6, p. 796-800, 2005.

COUVINHAS, A.; FERRANA, P.; COELHO, D.; JORGE, S.; WLATER, J. Ergonomic considerations for a systemic approach: the millenium maize mills project in northern Mozambique. **Work-Journal of Prevention Assessment and Rehabilitation**, v. 41, p. 568, 2012.

DE CASTRO MAGALHÃES, F.; BARRETTI, D.; HASHIMOTO, N.; MELO, S. F. S.; ROQUE, F. R.; DE OLIVEIRA, E. M. Hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico: eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 7, n. 1, 2008.

DEHAAN, R. L.; ORAHILLY, R. **Embriologia do coração: artérias e veias**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981, Cap. 2, v. 1, p. 6-19.

DESAI, M.; CROWTHER, N. J.; LUCAS, A.; NICHOLAS HALES, C. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. **British Journal of Nutrition**, v. 76, n. 04, p. 591-603, 1996.

DROTT, C.; LUNDHOML, K. Cardiac effects of caloric restriction-mechanisms and potencial hazards. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 7, p. 481-486, 1992.

EL-SAYED, H. L.; NASSAR, M. F.; HABIB, N. M.; ELMASRY, O. A.; GOMAA, S. M. Structural and functional affection of the heart in protein energy malnutrition patients on admission and after nutritional recovery. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 502-510, 2006.

EMERY, P. W. Metabolic changes in malnutrition. **Eye**, v. 19, n. 10, p. 1029-1034, 2005.

FAO. **The state of food insecurity in the world**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999.

FAO. **Undernourishment around the word**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006.

FAO. **The state of food insecurity in the world: economic crises – impacts and lessons learned**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009.

FAO. **The state of food insecurity in the word**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014.

FIORETTO, J. R.; QUERIOZ, S. S.; PADOVANI, C. R.; MATSUBARA, L. S., Okoshi, K.; Matsubara, B. B. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, n. 4, p. H1327-H1333, 2002.

FRANCO, M. C.; ARRUDA, R. M.; DANTAS, A. P.; KAWAMOTO, E. M.; FORTES, Z. B.; SCAVONE, C.; CARVALHO, M. H.; TOSTES, R. C.; NIGRO, D. Intrauterine undernutrition expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. **Cardiovascular Research**, v. 56, n. 1, p. 145-153, 2002.

FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 269-279, 2010.

GALANOPOULO, A. S.; MOSHE, S. L. Malnutrition and epilepsy. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78 p. 7-8, 2002.

GANONG, W. F. **Fisiologia médica**. 1989, 5. ed. São Paulo: Atheneu, p. 238.

GHEORGHE, C. P.; GOYAL, R.; HOLWEGGER, J. D.; LONGO, L. D. Placental gene expression responses to maternal protein restriction in the mouse. **Placenta**, v. 30, n. 5, p. 411-417, 2009.

GODART, N. T.; FLAMENT, M. F.; LECRUBIER, Y.; JEAMMET, P. Anxiety disorders in anorexia nervosa and bulimia nervosa: co-morbidity and chronology of appearance. **European Psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 38-45, 2000.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutrition**, v. 4, p. 611-624, 2001.

GÓMEZ, J. L.; CAMPOS, C.; RANGEL, P.; ORTIZ, R. Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Amsterdam**, v. 352, n. 1-2, p. 57-60, 1996.

GRACE, C. J.; SWENNE, I.; KOHN, P. G.; STRAIN, A. J.; MILNER, R. D. Protein-energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. **Diabete & metabolism**, Paris, v. 16, n. 6, p. 484-491, 1990.

GUEDES, R. C. A.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; TEODÓSIO, N. R. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 32-35, 2004.

HADDAD, L.; ACHADI, E.; BENDECH, M. A.; AHUJA, A.; BHATIA, K.; BHUTTA, Z.; REDDY, K. S. The global nutrition report 2014: actions and accountability to accelerate the world's progress on nutrition. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 4, p. 663-71, 2015.

HIANE, P. A.; MACEDO, L. R.; SILVA, G. M.; BRAGA, J. A. N. Avaliação nutricional da proteína de amêndoas de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd, em ratos wistar em crescimento. **B. Ceppa**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 191-206, 2006.

HOLDSWORTH, M.; KRUGER, A.; NAGO, E.; LACHAT, C.; MAMIRO, P.; SMIT, K.; GARIMOIR-ORACH, C.; KAMELI, Y.; ROBERFROID, D.; OLSTEREN, P. African stakeholders' views of research options to improve nutritional status in sub-Saharan Africa. **Health Policy and Planning**, v. 30, n. 7, p. 863-874, 2015.

HOWIE, G. J.; SLOBODA, D. M.; VICKERS, M. H. Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 2, p. 298-307, 2012.

JOHNSON, W. T.; JOHNSON, L. K. Copper deficiency inhibits Ca^{2+} -induced swelling in rat cardiac mitochondria. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 248-253, 2009.

JAHOR, F.; BADALOO, A.; REID, M.; FORRESTER, T. Protein metabolism in severe childhood malnutrition. **Annals of Tropical Pediatrics: international child health**, v. 28, n. 2, p.87-101, 2008.

JULIEN, M.; ALBUQUERQUE, O.; CLIFF, J.; ARAUJO, A.; MORAIS, A. Changing patterns in pediatric mortality, Maputo Central Hospital Mozambique, 1980–1990. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 41, p. 366–68, 1995.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. O. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.159-177.

KOTHARI, S. S.; PATEL, T. M.; SHETALWAD, A. N.; PATEL, T. K. Left ventricular mass and function in children with severe protein energy malnutrition. **International Journal of Cardiology**, v. 35, n. 1, p. 19-25, 1992.

LANGLEY-EVANS, S. C. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 4, p. 505-513, 2001.

LI, H.; STEIN, A. D.; BARNHART, H. X.; RAMAKRISHNAN, U.; MARTORELL, R. Associations between prenatal and postnatal growth and adult body size and composition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1498-1505, 2003.

LOPES, J. D. M.; GOMES, R. A. S. G.; HIAL, V.; LOPES, I. C. R.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Correlação entre o teor de colágeno no miocárdio ventricular esquerdo humano medido através de métodos bioquímico e morfométrico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 1, p. 10-14, 2002.

MACEDO, M. L. R.; DAMICO, D. C. S. Effects of protein fractions from Zea mays L. on development and survival of mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus* (Boh). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 20, p. 135-139, 2000.

MADI, K.; CAMPOS, S. D. Desnutrição experimental: resultados anatomo-patologicos e bioquímicos da administração de dietas hipoproteicas a ratos albinos jovens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 73, p. 153, 1975.

MALINA, R. M.; BOUCHARD, C. **Growth, maturation and physical activity**. Champaign: Human Kinetics Books, 1991, Cap. 10, p. 151-167.

MANDARIM-de-LACERDA, C. A. **Manual de quantificação morfológica**: morfometria, alometria e estereologia. 1991, Rio de Janeiro: CEBIO.

MANDARIM-de-LACERDA, C. A.; SOUZA, R. M. P. The growth of the embryonic rat myocardium (Carnegie stages 13 to 23). **Italian Journal of Anatomy and Embryology= Archivio Italiano di Anatomia ed Embriologia**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 43-55, 1994.

MARÍN, M. C.; DE TOMÁS, M. E.; SERRES, C.; MERCURI, O. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 4, p. 1017, 1995.

MARTOS, R.; BAUGH, J.; LEDWIDGE, M.; O'LOUGHLIN, C.; CONLON, C.; PATLE, A.; MCDONALD, K. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction circulation. **Circulation**, v.115, n.7, p.888-895, 2007.

MELO, J. F.; ALOULOU, N.; DUVAL, J-L.; VIGNERON, P.; BOURGOIN, L.; LEANDRO, C. G.; CASTRO, C. M. M. B.; NAGEL, M. D. Effect of a neonatal low-protein diet on the morphology of myotubes in culture and the expression of key proteins that regulate myogenesis in young and adult rats. **European Journal of Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 243-250, 2011.

MOMMA, K.; TADAHIKO, I.; MASAHIKO A. In situ morphology of the forame ovale in the fetal and neonatal rat. **Pediatric Research**, v. 32, p. 669-672, 1992.

MONTE, C. M. G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 3, p. 285-296, 2000.

MORGANE, P. J.; MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, W.; HALL, R.; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 2, p. 137- 230, 1978.

MORLEY, R.; LUCAS, A. Early diet and outcome in prematurely born children. **Clinical Nutrition**, Oxford, v. 12, p. S6-S11, 1993.

MOUTINHO, V. A. **Estado da arte no tratamento da subnutrição moderada enquadramento no centro de reabilitação nutricional** Pfuca U Famba. 2009. 5 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2009.

NAGANO, M.; OHKUBO, T.; ARINO, T.; TSUCHIYA, M.; NAGAI, M. **Growth factor for cardiac hypertrophy**. Tokyo, Japan: Springer US, p. 17-22, 1993.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFELERLE, E. **The anatomy of the domestic animals**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1981. v. 3. p. 15-38.

NORMAN, K.; LOCHS, H.; PIRLICH, M. Muscle dysfunction in malnutrition. **Current Nutrition & Food Science**, v. 1, n. 3, p. 253-258, 2005.

NOSZCZYK-NOWAK, A.; NICPOŃ, J.; NOWAK, M.; SLAWUTA, P. Preliminary reference values for electrocardiography, echocardiography and myocardial morphometry in the European brown hare (*Lepus europaeus*). **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, p. 1-6, 2009.

NUNES, M. L.; BATISTA, B. B.; MICHELI, F.; BATISTELLA, V. Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 39-44, 2002.

NÚÑEZ, H.; RUIZ, S.; SOTO-MOYANO, R.; NAVARRETE, M.; VALLADARES, L.; WHITE, A.; PÉREZ, H. Fetal undernutrition induced overexpression of CRH mRNA and CRH protein in hypothalamus and increases CRH and corticosterone in plasma during postnatal life in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 448, p. 115-119, 2008.

NUTTER, D. O.; MURRAY, T. G.; HEYMSFIELD, S. B.; FULLER, E. O. The effect of chronic protein-calorie undernutrition in the rat on myocardial function and cardiac function. **Circulation Research**, v. 45, n. 1, p. 144-152, 1979.

OLIVEIRA, B. C. C.; OLIVEIRA, F.; MARTINI, D. T.; PRISCO, C. R. D.; RIGUETTI, M. M. S.; LIBERTI, E. A.; BOLDRINI, S. C. The relative effects of severe burn injury and pre- and post-natal protein deprivation on mandibular condyle morphology. **Histology and Histopathology**, v. 25, p. 45-54, 2010.

ORTIZ, R.; CORTÉS, L.; MEDINA, H. Malnutrition alters the rates of apoptosis insplenocytes and thymocyte subpopulations of rats. *Clinical & Experimental Immunology*, London, v. 155, n. 1, p. 96-106, 2009.

OTIS, E. M.; BRENT, R. Equivalent ages in mouse and human embryos. *The Anatomical Record*, v. 120, p. 33-63, 1954.

PERNICK, N. M. D. Heart tumor cardiac tumors – begin endocardial fibroelastosis. **Pathology Outlines.com** 2013. Disponível em: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/hearttumorendocardialfibroelastosis.html>>. Acesso em: 06 nov. 2015.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 179-187, 2006.

RAMADAN, W. S.; ALSHIRAIHI, I.; AL-KARIM, S. Effect of maternal low protein diet during pregnancy on the fetal liver of rats. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 195, n. 1, p. 68-76, 2013.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, J. R. G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1931-1939, 1993.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.

RIEDL, S.; KLUGE, M.; SCHWEITZER, K.; WALDHO, T.; FRISCH, H. Adaptation of ghrelin and the GH/IGF axis to high altitude. **European Journal of Endocrinology**, v. 166, p. 969-976, 2012.

SAMAREL, A. M.; PARMACEK, M. S.; MAGID, N. M.; DECKER, R. S.; LESCH, M. Protein synthesis and degradation during starvation-induced cardiac atrophy in rabbits. **Circulation Research**, v. 60, n. 6, p. 933-941, 1987.

SARAIVA, L. R. **Estudo do coração na criança desnutrida com edema. Aspectos clínicos, eletrocardiográficos e ecocardiográficos.** 1990, 123 f. Dissertação - (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1990.

SARAIVA, L. R.; BRINDEIRO FILHO, D.; NORA, A. D. O coração na criança portadora de desnutrição calórico-proteica severa. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 58, n. 5, p. 353-7, 1992.

SAVINO, W.; DARDENE, M.; VELLOSO, L. A.; SILVA-BARBOSA, S. D. The thymus is a common target in malnutrition and infection. **British Journal of Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 1116, 2007.

SAWAYA, A. L.; SOLYMOS, G. M. B.; FLORÊNCIO, T. M. M. T.; MARTINS, P. A. Os dois Brasis: quem são, onde estão e como vivem os pobres brasileiros. **Estudos Avançados**, v. 17, n. 48, p. 21-44, 2003.

SGARBIERI, V. C. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: SGARBIERI, V. C. Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: **Ahmed**, p. 250-261, 1987.

SHARMA, R.; AGRAWAL, S.; SAXENA, A.; PANDEY, M.; SHARMA, R. K. Association of genetic variants of ghrelin, leptin and UCP2 with malnutrition inflammation syndrome and survival in end-stage renal disease patients. **Genes Nutrition**, v. 8, n. 6, p. 611–621, 2013.

SHRADER, R. E.; ZEMAN, F. J. Effect of maternal protein deprivation on morphological and enzymatic development of neonatal rat tissue. **The Journal of Nutrition**, v. 99, n. 4, p. 401-412, 1969.

SILVA, P.; STEVANATO, E.; MOREIRA, V. M.; PORTO, M.; MELLO, M. A. R. Efeitos da desnutrição intra-uterina e da recuperação nutricional sobre respostas metabólicas ao exercício crônico em ratos jovens. **Motriz**. v. 5, p. 152-159, 1999.

SIMA, A. Studies in fibre size in developing sciatic nerve and rehabilitated rats. **Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum**, v. 406, p. 1-55, 1973.

SPENCE, A. P. **Anatomia humana básica.** 2. ed. São Paulo: Manole, 1991. p. 290-339.

SRIVIVASAN, M.; PATEL, M. S. Metabolic programming in the immediate postnatal period. Tr. **Endocr. & Metabolism**. New York, v. 19, n. 4, p. 146-152, 2008.

STEVENS, G. A.; FINUCANE, M. M.; PACIOREK, C. J.; FLAXMAN, S. R.; WHITE, R. A.; DONNER, A. J. Trends in mild, moderate, and severe stunting and underweight, and progress towards MDG 1 in 141 developing countries: a systematic analysis of population representative data. **The Lancet**, v. 380, n. 9844, p. 824-834, 2012.

SUGIZAKI, M. M.; CARVALHO, R. F.; ARAGON, F. F.; PADOVANI, C. R.; OKOSHI, K., OKOSHI, M. P.; CICOONA, A. C. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to morphological damage in normotensive middle-aged rats. **Journal of Biomedical Science**, v. 12, n. 4, p. 641-649, 2005.

SUTTON, M. S. J.; PLAPPERT, T.; CROSBY, L.; DOUGLAS, P.; MULLEN, J.; REICHEK, N. Effects of reduced left ventricular mass on chamber architecture, load, and function: a study of anorexia nervosa. **Circulation**, v. 72, n. 5, p. 991-1000, 1985.

TAPPIA, P. S.; NIJJAR, M. S.; MAHAY, A.; AROUTIOUNOVA, N.; DHALLA, N. S. Phospholipid profile of developing heart of rats exposed to low-protein diet in pregnancy. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 5, p. R1400-R1406, 2005.

TIERNEY, E. P.; SAGE, R. J.; SHWAYDER, T. Kwashiorkor from a severe dietary restriction in an 8-month infant in suburban Detroit, Michigan: case report and review of the literature. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 5, p. 500-506, 2010.

TOMKINS, C. C. Does fetal under-nutrition predispose disease in adult offspring? **UAHSJ University of Alberta Health Sciences Journal**, v. 4, p. 16-20, 2007.

TOSCANO, A. E.; AMORIM, M. A. F.; DE CARVALHO FILHO, E. V.; DA SILVA ARAGÃO, R.; CABRAL-FILHO, J. E.; DE MORAES, S. R. A.; MANHAES-de-CASTRO, R. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? **Life Sciences**, v. 82, n. 21, p. 1131-1136, 2008.

VANDEWOUDE, M. F. J. Morphometric changes in microvasculature in rat myocardium during malnutrition. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 19, p. 376-380, 1995.

VAZZOLER, A. M. **Estudo morfoquantitativo do miocárdio do ventrículo esquerdo de ratas ooforectomizadas submetidas a exercício aeróbico**. 2008, 26 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

WEBER, K.; CLARK, W.; JANICKI J.; SHROFF S. Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 10, p. 537-550, 1987.

WEBER, K.; CLARK, W.; JANICKI J.; SHROFF S. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 13, n. 7, p. 1637-1652, 1989.

WEIGERT, C. Über eine Methode zur Färbung elastischer Fasern. **Zentralbl Allg Pathol Anat**, v. 9, p. 289-292, 1898.

WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various age. **The Journal of nutrition**, v. 89, p. 300-306, 1966.

WORLD HUNGER. Hunger Notes. 2011. Disponível em:
<http://www.worldhunger.org/articles/Learn/child_hunger_facts.htm>. Acesso em: 2 nov. 2014.

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. 2. ed. N. Jersey: Prentice-Hall, 1984.

ZEMAN, F. J. Effect on the young rat of maternal protein restriction. **The Journal of nutrition**. v. 93, p. 167-173, 1967.