
Avaliação metabólica e morfológica no Sistema Mastigatório em ratos Wistar submetidos a recuperação nutricional proteica

Metabolic and morphological evaluation in the Masticatory System in Wistar rats subjected to protein nutritional recovery

Bruno Ferreira Gonçalves e Silva¹, André Alves Lico Mascarim², Caio Biasi¹, Carlos Alberto da Silva³

¹Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paulista, Campinas-SP, Brasil; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano da Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba-SP, Brasil; ³Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paulista, Campinas-SP, Brasil.

Resumo

Objetivo – Avaliar, em ratos recuperados de desnutrição proteica, as condições fisiológicas dos músculos da articulação temporo-mandibular. **Métodos** – Foram utilizados ratos Wistar, inicialmente com 21 dias de vida (estudo aprovado pela CEUA da UNIMEP, protocolo 09/2015). Os animais foram divididos em grupos experimentais (N=10) assim denominados: Controle (C; tratados com dieta normoproteica durante 90 dias) e Recuperados pós-desnutrição (R; desnutridos com dieta hipoproteica durante 45 dias e a seguir tratados durante mais 45 dias com dieta normoproteica). Foram avaliados os seguintes itens: curva de peso semanalmente, concentrações plasmáticas de albumina (A) e proteína total (PT), reservas glicogênicas (G) e a relação proteína total/DNA (PT/DNA) dos músculos masseter, temporal e digástrico. Os valores foram comparados através de teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), ANOVA e teste de Tukey, $p < 0,05$. **Resultados** – Foi observada menor curva de peso no grupo R, o qual também apresentou menores concentrações de A e PT, indicando que a renutrição não propiciou a recuperação destes parâmetros até valores controle. O grupo R ainda apresentou menores concentrações de G nos músculos masseter, temporal e digástrico acompanhado de menores valores na relação proteína total/DNA, indicando que disfunções metabólicas ou estruturais gerados pela desnutrição podem ser duradouras. **Conclusão** – As alterações no perfil metabólico da musculatura mastigatória, geradas devido à restrição proteica são recuperadas parcialmente após renutrição, fato que compromete a dinâmica mastigatória, sendo sugestiva a possibilidade de gerar fadiga durante a mastigação.

Descritores: Desnutrição; Metabolismo; Recuperação nutricional

Abstract

Objective – To evaluate, in rats recovered protein malnutrition, the physiological conditions of the muscles of the temporomandibular joint. **Methods** – Wistar rats were used, initially with 21 days (study approved by CEUA UNIMEP, 09/2015 protocol). The animals were divided into experimental groups (N=10) named as follows: Control (C, treated with normal protein diet for 90 days) and Reclaimed post-malnutrition (R, malnourished a low protein diet for 45 days and then treated for a further 45 days). A normal protein diet were evaluated the following: weight curve weekly, plasma albumin concentrations (A) and total protein (PT), glycogen reserves (G) and the ratio of total protein/DNA (PT/DNA) of the masseter muscle, temporal and digastric. The values were compared using normality test (Kolmogorov-Smirnov), ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$. **Results** – We observed lower weight curve in the R group, which also had lower concentrations of A and PT, indicating that the renutrition didn't led to the recovery of these parameters to control values. The R group also had lower G concentrations in the masseter muscle, temporal and digastric accompanied by lower values in relation total protein/DNA, indicating that metabolic or structural dysfunctions generated by malnutrition can be lasting. **Conclusions** – The changes in the metabolic profile of the masticatory muscles, generated due to protein restriction are recovered partially after renutrition, fact that compromises the masticatory dynamics, being suggestive the possibility of generating fatigue while chewing.

Descriptors: Malnutrition; Metabolism; Nutrition recovery

Introdução

No aspecto funcional, a dinâmica do sistema estomatognático envolve ações integradas de diferentes estruturas, em particular, a articulação temporo-mandibular (ATM) que é composta de um grupo de estruturas ósseas e cartilaginosas cuja funcionalidade é controlada pela atividade neuromuscular e propiciam os movimentos da mandíbula durante o processo mastigatório¹. Mesmo considerando-se as diferenças entre as espécies, tem sido descrito semelhanças entre a estrutura da ATM do rato e a humana, assim, estudos estruturais e funcionais realizados com ratos tornam-se significativos para análise comparativa com seres humanos²⁻³.

A desnutrição proteica induz diversas alterações morfofisiológicas e funcionais afetando aspectos relacio-

nadas à absorção e metabolização de nutrientes, alterando a constituição corporal, o desenvolvimento e a evolução ponderal⁴⁻⁵. Estudos experimentais, com ratos desnutridos e posteriormente reabilitados do ponto de vista nutricional, são controversos quanto à recuperação de funções orgânicas e/ou estruturais, possivelmente devido ao restabelecimento das variáveis metabólicas e estruturais ser um processo lento⁶.

O modelo de desnutrição proteica aqui utilizado, é o que mais se assemelha ao que ocorre na população infantil e merece maiores avaliações, devido a importância social e científica na análise das consequências da desnutrição⁷⁻⁹. Estudos tem demonstrado que a carência alimentar nas fases iniciais da vida promove alterações multifatoriais e com potencial de irreversibilidade, porém, não há consenso na literatura¹⁰⁻¹¹.

Estudos com ratos desnutridos (dieta hipoproteica), demonstram redução em diferentes vias sinalizadoras bem como no diâmetro das fibras musculares, condição significativa ao se tratar do controle neuromuscular dos movimentos da ATM, trazendo reflexos negativos à mastigação¹². Importante salientar que, os tipos de fibras musculares do rato são equivalentes a aqueles descritos em humanos, permitindo a extrapolação dos achados em ratos para o homem¹³.

Considerando-se que as alterações descritas na desnutrição, o objetivo deste estudo foi avaliar, em ratos recuperados após desnutrição, o perfil metabólico dos músculos que participam da mastigação comparando-os com animais alimentados com dieta normoproteica.

Métodos

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 21 dias mantidos no Biotério da UNIMEP/Piracicaba em gaiolas coletivas contendo 5 animais/cada, sob condições ideais de bioterismo (água e alimento *ad libitum*; temperatura $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas). O estudo foi aprovado pela CEUA/UNIMEP (protocolo 09/2015). Os animais foram divididos em grupos experimentais contendo 10 animais cada e denominados: Controle (C; dieta normoproteica AN93, 14% de caseína) por 90 dias e Recuperados pós-desnutrição

(R; desnutrição induzida com dieta hipoproteica (AN, 6% de caseína, 45 dias) e sequencialmente tratados durante mais 45 dias com dieta normoproteica. As dietas foram adquiridas na PragSoluções Serviços e Comércio (Jaú, SP) cuja composição está descrita na Tabela 1.

A massa dos animais e das amostras foi determinada através de uma balança eletrônica. Para eutanásia, utilizou-se sobrecarga anestésica (Ketamina/Xilasina 50 mg/kg e 6 mg/kg peso, im., seguido de deslocamento cervical como preconiza o CONCEA). Foram coletadas amostras do sangue da artéria renal, centrifugado e o plasma direcionado para dosagem de Albumina e Proteínas totais através de KIT laboratorial. Amostras dos músculos masseter, temporal e digástrico (ventre rostral) foram coletadas e encaminhadas para dosagem do conteúdo de glicogênio¹⁴ e da relação proteína total/DNA através de KIT laboratorial. Logo após, a mandíbula foi retirada, dissecada e fotografada para comparação anatômica. Na análise estatística foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), análise variância (ANOVA) e teste de Tukey, $p < 0,05$.

Resultados

No Gráfico 1, pode-se observar que o grupo controle (C) apresentou ganho de massa diferenciado, ou seja,

Tabela 1. Composição das dietas (g/Kg) utilizadas no tratamento dos animais

Dieta AIN 93 M – 14%		Dieta AIN – 6% proteína (desnutrição)	
Ingredientes	p/1 kg	Ingredientes	p/1 kg
Amido de milho	465.700	Amido de milho	508.000
Caseína	140.000	Caseína	66.000
Amido dextrinizado	155.000	Amido dextrinizado	166.500
Sacarose	100.000	Sacarose	121.000
Óleo de soja	40.000	Óleo de soja	40.000
Fibra (Cel. Microcrist.)	50.000	Fibra (Cel. Microcrist.)	50.000
L-cistina	1.800	L-cistina	1.000
Cloreto colina	2.500	Cloreto colina	2.500
Mix mineral G	35.000	Mix mineral G	35.000
Mix vitamínico	10.000	Mix vitamínico	10.000
Total	1000.0	Total	1000.0

média de 50% até a 6ª semana, e de 10% até a 12ª semana. O grupo submetido à desnutrição, não apresentou variação na massa até a 6ª semana, tornando-se significativa somente quando foi iniciada a fase de recuperação nutricional, quando o ganho de massa foi progressivamente aumentando com média semanal de 20%, (Gráfico 1).

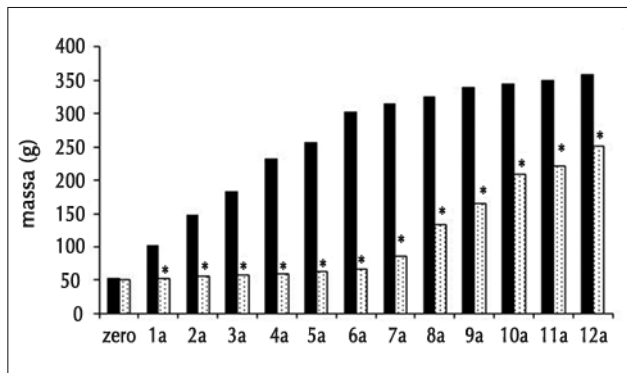


Gráfico 1. Massa corporal (g) semanal dos grupos tratados com dieta normoproteica (preto) e desnutrido/recuperado (pontilhado), sendo zero o dia que os animais chegaram ao biotério e representado da 1ª – 6ª semana o período de desnutrição e da 7ª – 12ª semana, período de recuperação nutricional. Os valores representam a média \pm dp, n = 10. * $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com dieta normoproteica

A título de caracterização do *status quo*, a Figura 1 mostra as mandíbulas dos grupos, e pode-se observar que no grupo recuperado a mandíbula é menor e representa 70% do peso observado no grupo C, indicando desproporção entre a mandíbula e a calota craniana.



Figura 1. Ratos Wistar durante as fases experimentais. 1 – animal tratado com dieta normoproteica (AN 93 – 14%) durante 45 dias; 2 – animal tratado com dieta hipoproteica (AN – 6%) durante 45 dias (desnutrido); 3 – animal tratado com dieta normoproteica (AN 93 – 14%) durante 90 dias; 4 – animal recuperado com dieta normoproteica (AN 93 – 14%) durante 45 dias após a desnutrição; 5 – Mandíbula do animal recuperado de desnutrição; 6 – Mandíbula do animal tratado com dieta normoproteica

Para caracterização do status de desnutrição e recuperação nutricional, foram avaliadas as concentrações plasmáticas de albumina [A] e proteínas totais [PT]. A Tabela 2 mostra que, na fase de desnutrição houve redução de 50,9% na [A] e 59,3% [PT]. No grupo R, foi observado que [A] e [PT] apresentaram-se 89% e 45,6% maiores, se comparado a fase de desnutrição, porém, ainda permaneceram 23% e 28,5% menores se comparados ao C.

Tabela 2. Concentração plasmática de albumina (g/dL) e proteína total (g/dL) dos grupos controle, desnutridos e recuperados de desnutrição. Os valores representam a média \pm dp, n=10. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ comparado ao grupo desnutrido

Grupos	Controle	Desnutridos	Recuperados
Proteína total (g/dL)	8,12 \pm 0,6	3,3 \pm 2,1*	6,24 \pm 0,8*,#
Albumina (g/dL)	3,26 \pm 0,1	1,60 \pm 0,02*	2,33 \pm 4*,#

Na avaliação do efeito da desnutrição sobre as reservas musculares de glicogênio (RG) foi observado no grupo R, pequenas RG atingindo 20% no músculo masseter, 28,5% e 33,3% nos músculos temporal e digástrico se comparados ao C (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração muscular de glicogênio (mg/100mg) dos grupos experimentais. Os valores representam a média \pm dp, n=10

Músculos	Controle	Recuperados
Masseter	0,25 \pm 0,006	0,20 \pm 0,01*
Temporal	0,21 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02*
Digástrico (ventre anterior)	0,24 \pm 0,008	0,16 \pm 0,02*

* $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com dieta normoproteica

Após constatar alterações quimiometabólicas, foi avaliada a relação proteína total/DNA (PT/DNA) sendo observado que os músculos dos animais R apresentaram menor PT/DNA, representado por valores 25% menores no masseter, 38% no temporal e 30% no digástrico.

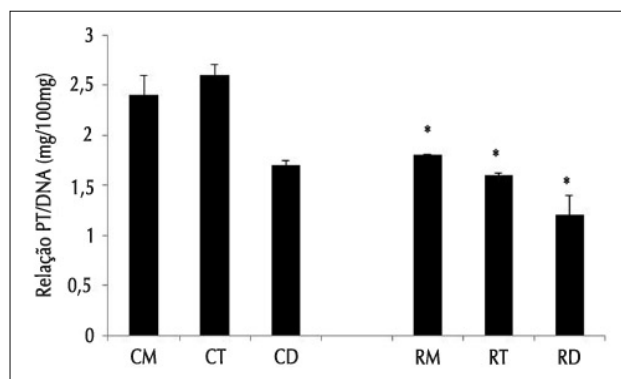


Gráfico 2. Relação proteína total/DNA (mg/100mg) dos músculos Masseter (M), Temporal (T) e Digástrico (D) dos animais controle (C) e recuperado de desnutrição proteica (R). Os valores representam as médias \pm dp, n = 10. * $p < 0,05$ comparado ao mesmo músculo controle

Discussão

Há tempo cientistas buscam entender os eventos desencadeados pela desnutrição proteica, sendo descrito importantes alterações causadas pela restrição nutricional, havendo consenso quanto aos déficits gerados, em especial na massa, tamanho e evolução ponderal em ratos⁸. Neste trabalho corrobora-se com a literatura ao demonstrar menor ganho de massa na fase de desnutrição, reiterando que a dieta foi efetiva e eficiente na indução da desnutrição¹⁵. Cabe ressaltar, que este

modelo de desnutrição é similar à do tipo Kwashiorkor, caracterizado em humanos^{4,6}.

Confirmando a implantação do quadro de desnutrição, foi demonstrado que os ratos tratados com dieta hipoproteica apresentaram baixas concentrações de PT e A, caracterizando o quadro de desnutrição e corroborando com a literatura¹⁷.

Na fase de recuperação nutricional, os animais ganharam massa, porém, ao final do período, ainda permaneceram menores que o C, e ainda, a renutrição não promoveu o reestabelecimento das concentrações de PT e A, indicando que algumas alterações geradas na desnutrição, não são recuperadas totalmente concomitante a recuperação nutricional¹⁸⁻²¹.

As alterações aqui descritas se inserem na hipótese do "*Thrifty phenotype*" que propõe que a recuperação tecidual é seletiva, de forma que, os desajustes metabólicos gerados na desnutrição podem promover alterações irreversíveis, como descrito no processo de mielinização e maturação do sistema nervoso²²⁻²³. Os resultados indicam que a desnutrição hipoproteica não oferece o suprimento ideal de aminoácidos para a formação de hormônios ou fatores que atuam no desenvolvimento ponderal e de crescimento¹⁸⁻¹⁹.

Na avaliação das reservas glicogênicas dos músculos que participam da dinâmica mastigatória, foi observado baixas concentrações nos animais recuperados de desnutrição, e pode ter relação com a redução na eficiência da sinalização insulínica, sendo sugestivo que na desnutrição proteica, o músculo esquelético pode não ser um tecido primariamente contemplado na recuperação metabólica e funcional^{10,20-23}.

Tem sido descrito na literatura, que a desnutrição promove múltiplos desajustes, com destaque nas vias sinalizadoras citosólicas, na função mitocondrial, na atividade oxidativa limitando a refosforilação do ADP para ATP e restringindo a relação síntese/degradação de glicogênio, uma vez que, as enzimas da via glicogênica necessitam da presença do ATP²⁴⁻²⁵. Neste sentido, demonstra-se que a desnutrição proteica leva a desajustes no controle quimiometabólico muscular, condição que pode interferir na funcionalidade mastigatória e promover fadiga durante o ato mastigatório; ressalta-se que esta alteração permanece após a renutrição.

A mesma linha de raciocínio se aplica na análise do peso e da relação proteína total/DNA do músculo masseter, onde foi observado perfil similar ao descrito para as reservas glicogênicas, ou seja, redução frente a desnutrição e deficiência na recuperação nutricional. Este dado retrata o comprometimento nas vias sinalizadoras insulínicas, uma vez que, existe forte relação entre as dinâmicas de geração de energia e a atividade da enzima AMPK bem como da enzima mTOR²⁶⁻²⁷.

A análise comparativa das mandíbulas, do grupo de ratos recuperados com o grupo controle, mostrou alterações no tamanho e peso, indicando que frente a desnutrição pode ocorrer comprometimento no desenvolvimento da ossificação craniofacial, como sugerido²⁸⁻³⁰.

Alippi *et al.*²⁰ estudaram o crescimento da mandíbula de animais desnutridos e verificaram desproporções e deformações ósseas, se comparadas com a mandíbula de animais nutridos com dieta normoproteica, estudo reiterado posteriormente pelos mesmos autores¹⁹. Neste trabalho foi observado diferenças no tamanho e peso da mandíbula, mesmo após a renutrição, e cabe ressaltar que frente a redução na eficiência das vias metabólicas, torna-se sugestiva a possibilidade de ocorrer fadiga muscular durante a alimentação, influenciando expressivamente na dinâmica mastigatória.

Por fim, os dados aqui apresentados podem ser transpostos para humanos, uma vez que foi demonstrado, através de recente estudo morfométricos e histológicos que a estrutura articular da ATM de ratos é similar à de humanos^{3,23}.

Conclusão

As alterações no desenvolvimento da ATM e no perfil metabólico da musculatura mastigatória, quando geradas devido à desnutrição proteica nas fases iniciais da vida, são recuperadas parcialmente após renutrição e podem comprometer a dinâmica mastigatória.

Referências

1. Busanello-Stella AR, Silva AMT, Corrêa E. Pesquisa da fadiga nos músculos faciais e mastigatórios: revisão da literatura. Rev CEFAC. 2014;16(5):1627-38.
2. Cleall JF, Wilson GW, Garnett DS. Normal craniofacial skeletal growth of the rat. Am J Phys Anthropol. 1968;29(2):225-42.
3. Porto GG, Vasconcelos BCE, Andrade ESS, Silva-Junior VA. Comparison between human and rat TMJ: anatomic and histopathologic features. Acta Cir Bras. 2010;25(3):290-3.
4. Valadares CT. Efeitos da desnutrição proteica pós-natal no desempenho de ratos em diferentes tarefas de aprendizado e memória [Tese de doutorado]. Universidade de São Paulo: 2006.
5. Leal VS, Lira PIC, Menezes RCE, Oliveira JS, Costa EC, Andrade SLLS. Desnutrição e excesso de peso em crianças e adolescentes: uma revisão de estudos brasileiros. Rev Paul Pediatr. 2012;30(3):415-22.
6. Valadares CT, Fukuda MTH, Françolin-Silva AL, Hernandez AS, Almeida SS. Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. Nutr Neurosc. 2010;13(6):74-282.
7. Gopalan, S. Malnutrition: causes, consequences, and solutions. Nutrition. 2000;16(7-8):556-8.
8. Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistella V. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. J Pediatr. 2002;78(1):39-44.
9. Merino-Sanjúan M, Catalán-Latorre A, Náchter A, Miralles-Arnau S, Jiménez-Torres NV. Animal Model of undernutrition for the evaluation of drug pharmacokinetics. Nutr Hosp. 2011;26(6):1296-304.
10. Almeida PBL, Mello MAR. Desnutrição proteica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. Rev Bras Educ Fis Esp. 2004;18(1):17-30
11. Costarelli V, Emery PW. The effect of protein malnutrition on the capacity for protein synthesis during wound healing. J Nutr Health & Aging. 2009;13(5):409-12.

12. Toyoshima Y, Tokita R, Ohne Y, Hakuno F, Noguchi T, Minami S, *et al.* Dietary protein deprivation upregulates insulin signaling and inhibits gluconeogenesis in rat liver. *J Mol Endocrinol.* 2010;45(5):329-40.
13. Okada M, Araújo S, Franco M, Paola A, Fenelon G. Efeitos dos corticoesteroides nas lesões por radiofrequência na coxa de ratos em diferentes faixas etárias. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(2):207-14.
14. Lo S, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol.* 1970;28(2):234-6.
15. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-51.
16. Reid CL, Campbell IT. Metabolic physiology. *Current Anaesthesia.* 2004;15:209-17.
17. Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistella V. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. *J Pediatr.* 2002;78(1):39-44.
18. Neiva CM, Melo MAR. Análise dos efeitos da desnutrição proteico-calórica sobre as respostas ao exercício agudo e parâmetros metabólicos. *Motriz.* 1999;1(1):32-7.
19. Bozzini C, Champin GM, Bozzini CE, Alippi RM. Growth inhibition in rats fed inadequate and incomplete proteins: repercussion on mandibular biomechanics. *Acta Odontol Latino Am.* 2013;26(1):43-53.
20. Alippi RM, Meta MD, Olivera MI, Bozzini C, Schneider P, Meta IF, Bozzini CE. Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. *Arch Oral Biol.* 2002;47(1):47-53.
21. Latorraca MQ. Descrição de dieta purificada para indução de quadro de desnutrição proteica em ratos. *Rev Bras Med Esporte.* 1998;4(1):9-12.
22. Bortolini ACM. Efeito de diferentes modelos de desnutrição sobre parâmetros bioquímicos hepáticos plasmáticos e cerebelares de ratos de 21 dias [Dissertação de mestrado] Rio Grande do Sul: Universidade Federal; 2005.
23. Tuxen A, Kirkeby S. An animal model for human masseter muscle: histochemical characterization of mouse, rat, rabbit, cat, dog, pig and cow masseter muscle. *J Oral Maxillo Fac Surg.* 1990;48:1063-7.
24. Rodrigues L. Avaliação da reparação e indicadores de desnutrição de ratos submetidos à fratura de côndilo mandibular e com desnutrição proteica [tese de doutorado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.
25. Tsai CY, Lin YC, Su B, Yang LY, Chiu WC. Masseter muscle fiber changes following reduction of masticatory function. *Int J Oral Maxillo Fac Surg.* 2012;41(3):394-9.
26. Adegoke OA, Abdullahi A, Tavajohi-Fini P. mTORC1 and the regulation of skeletal muscle anabolism and mass. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2012;37(3):395-406.
27. Toyoshima Y, Tokita R, Taguchi Y, Akiyama-Akanishi N, Takenaka A, *et al.* Tissue-specific effects of protein malnutrition on insulin signaling pathway and lipid accumulation in growing rats. *Endocr J.* 2014;61(5):499-512.
28. Miller JP, German RZ. Protein malnutrition affects the growth trajectories of the craniofacial skeleton in rats. *J Nutr.* 1999;129:2061-9.
29. Bozzini CE, Champin G, Alippi RM, Bozzini C. Bone mineral density and bone strength from the mandible of chronically protein restricted rats. *Acta Odontol Latinoam.* 2011;24(3):223-8.
30. Nakamoto T, Miller AS. Physical and biochemical changes of the mandible and long bone in protein-energy malnourished newborn rats. *J Nutr.* 1979;109:1477-82.

Endereço para correspondência:

Bruno Ferreira Gonçalves e Silva
Rua Salomão Mussi, 381 – Barão Geraldo
Campinas-SP, CEP 13084-773
Brasil

E-mail: brufgsilva@outlook.com

Recebido em 13 de junho de 2016
Aceito em 27 de junho de 2016