

CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÚSCULO ESTRIADO NA DESNUTRIÇÃO PROTEICA

ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS ALBINOS

OSVALDO J. M. NASCIMENTO* — KALIL MADI**

JOAO BATISTA GUEDES E SILVA*** — PORPHIRIO J. SOARES FILHO***

MYRIAM D. HAHN*** — BERNARDO COUTO**** — MARCOS R. G. FREITAS*

RESUMO — Os efeitos da desnutrição sobre o músculo «gastrocnemius plantaris» de ratos albinos, limitando-se à genitora a dieta em 6,7% de proteínas e aos seus produtos, em 3,2% após o desmame, foram observados em microscopia óptica e eletrônica e comparados com os controles. Os animais, em número de 40, foram distribuídos em grupo hipoproteico e normal, sendo a metade de cada grupo sacrificada aos 15 dias e a restante, após o desmame, aos 30 dias. Observamos acentuada redução ponderal dos ratos com alimentação hipoproteica, chegando a cerca de 50% em relação aos normais. As fibras do músculo estudado, nos ratos desnutridos, apresentaram importante redução de seus diâmetros. As reações histoquímicas revelaram que tanto as fibras do tipo I como as do tipo II estavam comprometidas, ocorrendo maior redução nas últimas. Fibras do tipo II, de pequena espessura, com aspecto de fibra F (fetal) foram encontradas nos animais subnutridos de 15 dias, denotando retardo na maturação destas fibras. As avaliações em ultramicroscopia não mostraram alterações específicas da ultra-estrutura muscular, revelando apenas intensa redução do calibre das fibras, quando comparadas às dos ratos normais. Concluimos pela hipoplasia e não atrofia do tecido muscular dos animais submetidos a desnutrição pré e pós-natal. O presente estudo, somado a outros nos quais foram analisados a ponta anterior da medula e o nervo periférico de ratos desnutridos, permite-nos considerar que na privação proteica ocorrem retardo no desenvolvimento e hipoplasia da unidade motora. Conjecturamos a possibilidade de, na amiotrofia espinhal progressiva da infância (doença de Werdnig-Hoffmann), acontecer também hipoplasia das fibras do tipo II e não atrofia, aventando a hipótese de, nesta doença, haver alterações no metabolismo proteico.

Considerations about the striate muscle in protein deprivation: an experimental study in albino rats.

SUMMARY — The effects of undernutrition on the «gastrocnemius plantaris» muscle of young albino rats were observed with light and electronmicroscopy and were compared with controls. Pregnant rats received a diet containing 6.7% protein and the neonates had a 3.2% protein diet after weaning. A total number of 40 animals were distributed in two groups: one hypoproteic and one control. Half of the animals of each group were killed 15 days after birth and the remaining ones at 30 days. We could observe important reduction in the weight of the undernourished rats reaching about 50% when compared with the control animals. An important reduction in the diameter of muscle fibers was noted in undernourished rats. Histochemical reactions showed that not only the type I but also the type II fibers were involved, the latter being more severely reduced in size. Type

Trabalho da Disciplina de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense (UFF): * Professor Adjunto de Neurologia da UFF e UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro); ** Chefe do Departamento de Patologia da UFRJ; *** Professor Adjunto de Anatomia Patológica da UFF; **** Professor Titular de Neurologia da UFRJ.

Dr. Osvaldo J. M. Nascimento — Disciplina de Neurologia, Departamento de Medicina Clínica, UFF - Hospital Universitário Antonio Pedro - Rua Marquês do Paraná s/nº - 24200 Niterói RJ - Brasil.

II fibers of small diameter, resembling F (fetal) fiber were found in animals at 15 days indicating a delay in maturation. Ultrastructural evaluation of the muscle did not show specific changes except for a severe reduction in the caliber of fibers when compared with control animals. We concluded that there was hypoplasia and not atrophy of the muscular tissue in animals submitted to pre- and post-natal undernutrition. The present study, associated with others in which the spinal motor cells and peripheral nerves of undernourished rats were analysed, allow us to consider that with protein deprivation there is a delay in the development, a hypoplasia of the motor unit. We think that in infantile progressive spinal amyotrophy (Werdnig-Hoffmann disease) there is possibly hypoplasia and not atrophy of the type II fibers and we postulate that a metabolic proteic problem is involved in this disease.

O nosso país bem representa aqueles nos quais a carência protéico-calórica vem a desencadear perturbações de ordem médica várias. A resultante é a grande morbidade e mortalidade na fase de maior importância do desenvolvimento do organismo humano, a infância, acometendo particularmente, dentre outros, o tecido muscular, segmento de maior armazenamento protéico da economia. Consistindo esse órgão no único capaz de converter energia química em energia mecânica, o inadequado suprimento de calorias e proteínas acarreta certamente alterações morfo-funcionais.

No desenvolvimento de nosso trabalho levamos ratas albinas ao estado de carência protéica no período gestacional e sacrificamos exemplares da prole com 15 e 30 dias de vida, também mantidos em igual situação alimentar. Tivemos como objetivo o estudo das alterações estruturais do músculo gastrocnêmico destes animais. Este modelo experimental de desnutrição exemplifica o que se observa em nosso meio, quando não só a criança, mas também a mãe vêem-se em situação de pobreza protéica na dieta. Tentamos a princípio elaborar nosso estudo comparando a desorganização morfológica muscular obtida experimentalmente com os achados em crianças lactentes, porém esbarramos no conceito ético, que sabidamente não admite biópsias em crianças sem efeito diagnóstico ou terapêutico. Passamos então a fazer observações «post-mortem». Estas não exprimiram a realidade, pois embora fizéssemos a tomada deste tecido estriado imediatamente após o óbito notamos em ultra-estrutura desarranjos específicos de autólise. Resolvemos deste modo aplicar nossa atenção para uma avaliação experimental que serve como verdadeira tradução do problema.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e privação protéica — Foram utilizados 40 ratos albinos jovens da cepa Wistar do Instituto Oswaldo Cruz, distribuídos em um grupo controle, com dieta normal, e um grupo levado ao estado desnutricional. Os animais foram submetidos a privação protéica congênita, de acordo com o modelo preconizado por Stewart e col. 30. Metade das ratas prenhes recebeu durante a gestação uma ração de 6,7% de proteínas enquanto a outra metade foi oferecida ração com 20% de proteína, normoprotéica, do Moinho São Cristovão (MSC). A prole de ratos hipoprotéicos consumiu ração com 3,2% de proteína, após o desmame com 22 dias, enquanto a dos normoprotéicos foi alimentada com ração MSC. A complementação vitamínica seguiu a orientação de Madi e col. 17,18, administrando-as por aplicação nos «pellets» duas vezes por semana. Dentre os animais, 20 exemplares desnutridos foram separados para avaliação e igual número de controles. A observação do comportamento e possível aparecimento de anormalidades motoras foi levada a efeito. Foram sacrificados 10 ratos com 15 dias e o mesmo número com 30 dias de vida, de cada grupo, por deslocamento cervical, entre machos e fêmeas, tomando-se o peso de cada um. Imediatamente foram retirados os músculos gastrocnêmicos de cada roedor.

Técnicas histológicas — Para a microscopia de luz procedeu-se conduta de rotina com fixação do tecido estriado em formaldeído salino a 10%. O restante do material foi transportado em solução salina a 0,9%, gelada a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, ficando em repouso por 15 minutos, sendo então congelado em nitrogênio líquido. Posteriormente, os espécimes foram montados em suporte metálico, sendo, então, submetidos a cortes seriados de 8 micra em criostato. Efetuamos colorações de rotina, como a hematoxilina e eosina. Em todos os casos aplicou-se a reação pelo ácido periódico reativo de Schiff e a técnica trícromica de Gomori. No grupo das técnicas enzimáticas empregou-se a desidrogenase succínica (SDH). A ATPase miosínica foi utilizada para evidenciar os tipos de fibras de acordo com a faixa do pH de pré-incubação (pH 9,4, pH 4,6 e pH 4,35). Parte de cada fragmento do tecido muscular foi destinada à

microscopia eletrônica, sendo fixada por 2 horas em glutaraldeído a 2M (2,5%), em pH 7,4, com posterior clivagem e processamento. Foi usada resina «Polylite T 223-E» e «Polylite 8001», procedendo-se após polimerização, aos cortes semifinos e ultrafinos. Para análise ultra-estrutural foi usado o microscópio da Carl Zeiss modelo EM-109.

RESULTADOS

Os animais desnutridos apresentaram importante redução ponderal em relação aos controles da mesma idade, chegando a cerca de 50%. Notamos discreto aumento da curvatura dorsal e leve rarefação de pelos no grupo hipoprotéico. Estes ratos não manifestaram distúrbio evidente de suas funções motoras. Comportaram-se de modo mais ativo e agressivo que os normais, dificultando, por vezes, a captura. O «gastrocnemius plantaris» dos ratos subnutridos exibia palidez e menores dimensões que o dos saudáveis.

Microscopia óptica — Nos ratos normais, as fibras mostravam suas estriações, distribuição nuclear e angulações usuais. Nas reações pela ATPase (pH 9,4), dois tipos distintos de fibras foram identificados nos ratos com 15 dias: o tipo I, que era dominante, e fibras menores, com forte reação à ATPase (tipo II), que consistiam em menos da metade do total de fibras. Aos 30 dias, estas fibras praticamente desapareceram, dando lugar às do tipo IIA. Nos animais em carência protéica, com 15 dias, verificamos acentuada redução da espessura das fibras e ligeiro aumento do espaço interfascicular (Fig. 1a). As colorações histoquímicas traduziram este acontecimento como redução do diâmetro das fibras do tipo I e II, sendo mais notável nas últimas, com fibras F (fetais) diminuídas (Fig. 1b). Estas, no pH 4,3 assumiam características da fibra II C. Na coloração pelo SDH, as fibras com menor reação são as do tipo II e as mais escuras, do tipo I. Nos vários campos microscópicos, esta coloração confirmou o predomínio do menor calibre das do tipo II. Os ratos normais, após o desmame, com 30 dias, mostravam diferenciação de suas fibras: crescimento maior das do tipo IIA, no pH 4,6. As fibras mantinham o aspecto em «mosaico», com calibre bem superior ao dos animais do outro grupo. Nestes, as fibras tipo I e II estavam redu-

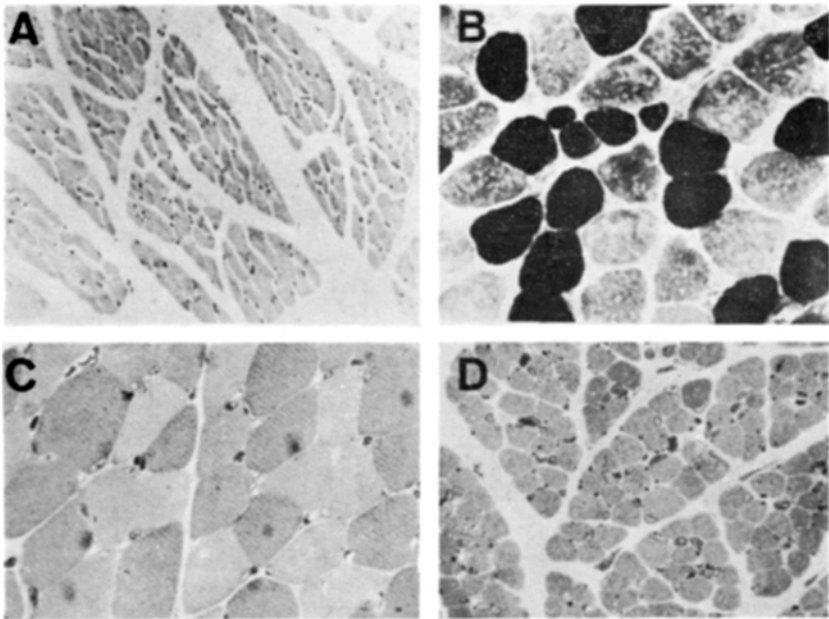


Fig. 1 — A (rato de 15 dias, desnutrido): fibras de reduzido diâmetro, com aumento do espaço interfascicular (HE 100×). B (rato de 15 dias desnutrido): fibras tipo I e II com diâmetro reduzido, visualizando-se pequenas fibras tipo II, tipo F (ATPase pH 9,4, 360×). C: fibras cortadas transversalmente em animal controle de 30 dias (azul de toluidina, 360×). D (rato de 30 dias desnutrido): redução do diâmetro das fibras; comparar com as dos controles. Os núcleos mantém seu tamanho habitual. Interstício alargado contendo fibroblastos (azul de toluidina, 360×).

zidas em diâmetro, com maior intensidade nas últimas, havendo a ocorrência de fibras lembrando as angulares. Os cortes espessos, de aproximadamente 1 μm , feitos em material incluído em Polylyte e corados pelo azul de toluidina, mostraram acentuada redução no diâmetro das fibras dos animais desnutridos, quando comparadas aos dos controles. Interessante foi a observação de que apenas o volume sarcoplasmático se reduziu, mantendo-se os núcleos com o tamanho normal. O interstício achava-se bastante alargado, contendo alguns fibroblastos (Fig. 1c e 1d).

Microscopia eletrônica — A análise ultra-estrutural do tecido muscular dos animais subnutridos revelou fibras musculares apresentando manifesta redução nos seus diâmetros. Tal alteração foi vista em cortes longitudinais, tornando-se evidente em cortes transversais, quando comparada a incidências semelhantes, em tecido estriado dos ratos controles (Fig. 2a e 2b). Nos grupamentos das fibras reduzidas em diâmetro observamos que os espaços intercelulares achavam-se alargados, contendo vasos capilares, fibroblastos e escasso colágeno fibrilar, não parecendo haver aumento do conjuntivo intersticial, quando comparado aos controles. O exame em maior aumento das fibras modificadas revelou estrutura miofibrilar e miofilar mantida, estando presente o arranjo habitual do sarcômero, com suas faixas e linhas (Fig. 2c). As mitocôndrias apresentavam-se normalmente dispostas entre as miofibrilas, ora pouco numerosas, mais evidentes de cada lado da linha Z (fibras com baixa atividade oxidativa), ora mais numerosas, formando fileiras entre as miofibrilas (fibras de elevada atividade oxidativa), tanto nos desnutridos (Fig. 2d) como nos controles. Acúmulos de mitocôndrias subsarcolemais foram vistos nas regiões paranucleares (Fig. 2d). Em linhas gerais, nas mitocôndrias não ocorreram alterações significativas. Suas estruturas internas apresentaram-se ocasionalmente modificadas, com aclaramento da matriz, cristólise

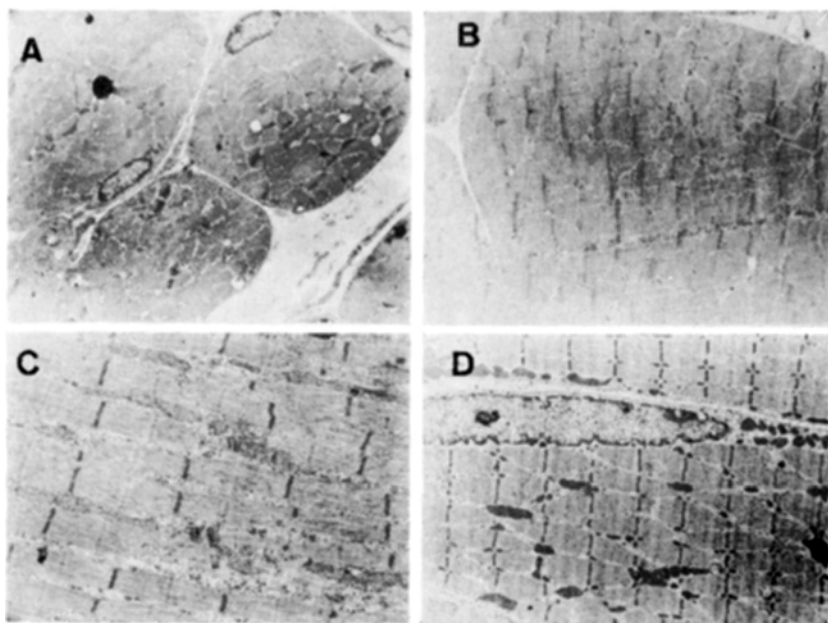


Fig. 2 — Microscopia eletrônica. A (rato de 30 dias, desnutrido): acentuada redução do diâmetro das fibras; espaço intercelular no ângulo inferior direito alargado, apresentando prolongamentos citoplasmáticos de fibroblastos e colágeno fibrilar; gotículas lipídicas na fibra no ângulo superior esquerdo (3300 \times). B (animal controle de 30 dias): comparar o diâmetro normal desta fibra com o das fibras da figura anterior, em aumento idêntico (3300 \times). C (rato de 15 dias, desnutrido): corte longitudinal de fibras reduzidas em diâmetro; observar miofibrilas com estrutura habitual, distinguindo-se as linhas Z, as faixas A, H e M (1200 \times). D (rato de 15 dias, desnutrido): fibra centralmente localizada cortada obliquamente, com núcleo sarcolemal; mitocôndrias próximas às linhas Z ou em acúmulo paranuclear subsarcolemal (4400 \times) — Prof. J. B. Guedes e Silva.

e tumefação de padrão hidrópico. Tais alterações foram igualmente encontradas nos controles (Fig. 3a) e foram consideradas artefatos de técnica, devidos ou a fixação inadequada ou ao uso de soluções fixadoras hipotônicas. Os grânulos de glicogênio estavam dispersos, em forma e quantidade usuais, em ambos os grupos. Em animais desnutridos (30 dias), notamos aumento do número de gotículas lipídicas, que se situavam entre as miofibrilas ou abaixo do sarcolema, estando, por vezes, intimamente envolvidas por mitocôndrias (Fig. 3b). Não foram observadas diferenças nos núcleos dos dois grupos investigados. As fibras musculares achavam-se delimitadas por sarcolema e lâmina externa sem alterações.

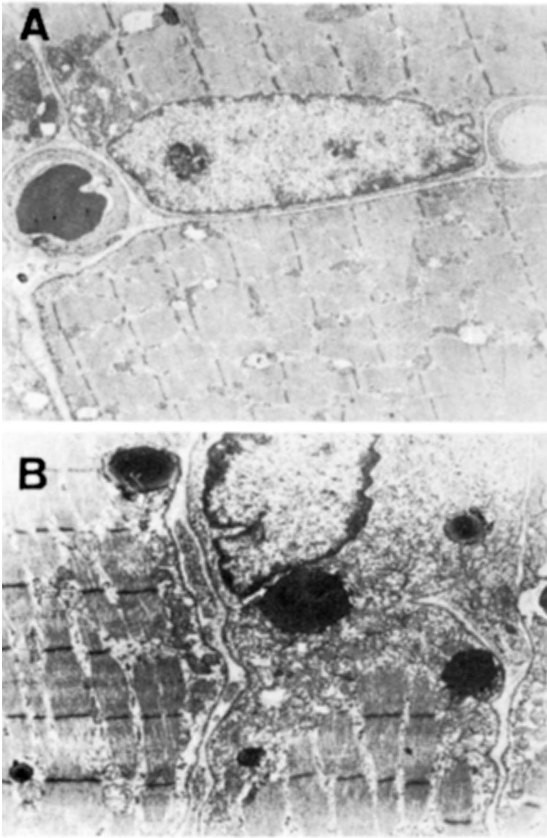


Fig. 3 — Microscopia eletrônica. A (rato de 30 dias, controle): alterações mitocondriais artificiais ligadas ao processamento técnico (4400X). B (rato de 30 dias, desnutrido): são vistas três fibras com gotículas lipídicas, envolvidas por mitocôndrias; grânulos de glicogênio evidentes, assim como as membranas celulares e lâminas externas (7000X) — Prof. J. B. Guedes e Silva.

COMENTÁRIOS

O modelo experimental que utilizamos parece-nos bem retratar o que acontece com as crianças desnutridas, em nosso meio. Esta observação ganha sentido pelo fato de que, em alguns experimentos^{4,10,22,27}, a privação alimentar se faz drasticamente, não traduzindo, em suas severas perturbações morfo-funcionais, o que se verifica na maioria dos casos de crianças subnutridas. Dastur e col.⁵, em extensa revisão feita em 1982 e Oldfors e col.²², em 1983, comentam que poucos estudos morfológicos do músculo na privação alimentar foram realizados. Vários órgãos e sistemas estão comprometidos na carência alimentar, como assinalam Madi e col.¹⁶⁻¹⁹. Em determinados sistemas, a interação e repercussões estruturais não estão ainda bem estabelecidas. Tomamos como exemplo o sistema neuromuscular. Ocorreria na carência protéica dano maior no nervo, no músculo, ou em ambos em igual proporção?

Kumar e col.¹⁵, avaliando 93 crianças indianas desnutridas, verificaram redução da velocidade de condução nervosa, particularmente nos membros inferiores. Singh e col.³⁰ fizeram observações semelhantes. Sachrev e col.²⁸, em 1971, foram os primeiros a analisar o envolvimento neuromuscular em crianças com «kwashiorkor» pela velo-

cidade de condução nervosa e eletromiografia, encontrando, nas 30 crianças indianas estudadas, padrão miopático em 10 e de lesão do nervo periférico em 12. Em algumas foram notados potenciais de fibrilação. Estes autores consideram que as alterações musculares seriam de origem neurogênica, por lesões ao nível do nervo periférico e/ou da ponta anterior da medula. Estudos histológicos descritivos de lesões na ponta anterior da medula e/ou no nervo periférico foram feitos por Benton e col.¹, Chase e col.³, Platt e Stewart²⁶ e Sima²⁹, em trabalhos experimentais. Utilizando processo desnutricional em ratos Sprague-Dawley desde a vida intra-uterina, Sima²⁹ conclui que ocorre deficiência no crescimento e no calibre das fibras nervosas do ciático e suas raízes, sendo mais intensa nas fibras grossas. Acrescenta que nos animais que foram submetidos a reabilitação alimentar esta redução do diâmetro das fibras foi parcialmente revertida, permanecendo a redução do crescimento. Montgomery²⁰ estudou o músculo «sartorius» de 6 crianças da Jamaica, que morreram de desnutrição proteico-calórica entre os 8 e 16 meses de vida. Verificou importante redução do calibre das fibras musculares e aumento do tecido conjuntivo interfascicular. As fibras chegaram a um tamanho comparável às de fetos entre a 31ª e 36ª semanas. Crianças jamaicanas subnutridas, em número de 25, foram observadas por Hansen-Smith e col.¹¹, que verificaram extrema atrofia muscular e difícil recuperação, quando da reposição dietética adequada. Sachdev e col.²⁸, examinando biópsias de menores subnutridos, perceberam igual adelgaçamento de fibras, concluindo por ser de natureza neurogênica, tendo em perneio, aspecto miopático. Howells e col.^{13,14} referem que o crescimento do tecido estriado esquelético está prejudicado na privação protéica.

No presente trabalho, observamos importante diminuição do calibre das fibras do músculo gastrocnêmico nos ratos desnutridos, com 15 dias e após o desmame, com 30 dias. Este aspecto foi notado por outros autores, no «gastrocnemius»^{2,32,33}, no «extensor digitorum longus»^{9,13,23} e outros^{4,10,14}. Percebemos a presença de fibras com calibre muito reduzido, parecendo corresponder às fibras F descritas por Haltia e col.⁹. Estas fibras, ainda presentes nos animais com 15 dias, denotam retardo no seu crescimento e diferenciação. A considerável redução do calibre das fibras aponta não tão somente para uma privação alimentar, mas permite-nos algumas apreciações. Tanto as fibras do tipo I como as do tipo II mostraram calibres bem menores que as dos ratos controles. Tal verificação coincide à de outros autores^{9,22,33}. As do tipo II dos ratos em questão, com 15 e 30 dias, foram as que mostraram maior comprometimento, como percebido em determinando ensaios^{9,13,33}. Acrescentamos, no entanto, que este aspecto histológico configura hipoplasia das fibras do músculo estudado e não atrofia, pois o tecido desenvolveu-se de modo insuficiente desde intra-útero. Preferimos reservar o termo atrofia para aqueles achados de diminuição de calibre das fibras quando o animal de experimentação foi desnutrido após a maturação do seu sistema muscular. Onofre²⁴, em 1987, relatou o efeito da desnutrição aguda, durante 12 dias, sobre o diafragma de coelhos, com idade média inicial de 17 semanas. Nesta avaliação, percebeu real atrofia das fibras do músculo em lide, que chegaram a ter o calibre de 19,47 micra, quando nas normais era de 26,47 micra. No presente estudo, verificamos a existência de fibras com aspecto lembrado as angulares, em animais com 30 dias, do grupo desnutrido. Quando a fibra muscular adquire este aspecto, sugere denervação³⁴. Na literatura, encontramos relato semelhante, feito por Walsh e col.³³, estudando o mesmo segmento muscular de ratos Osborn-Mendel, desnutridos quando já pesavam 237/494 g.

As nossas verificações em microscopia eletrônica ratificaram as feitas em microscopia de luz quanto à redução pronunciada do calibre das fibras musculares. Não percebemos a quase completa ausência de mitocôndrias subsarcolemais como também a perda do arranjo miofilar/mitocondrial, como descreveram Oldfors e col.²². Estes desnutriram ratos Sprague-Dawley a partir da 6ª semana, examinando o «extensor digitorum longus» na 25ª semana. Utilizando a mesma cena de ratos, com 127± 4 g., Hansen-Smith e col.¹⁰, estudando o quadriceps notaram aspecto semelhante. Nenhuma perturbação da estrutura mitocondrial foi detectada, ocorrendo preservação das cristas, como aconteceu nos nossos roedores. Walsh e col.³³ igualmente não notaram danos mitocondriais. Pensamos que estes desarranjos ultra-estruturais descritos sejam devidos à intensidade e período em que se procedeu a privação protéica, bem como à interpretação incorreta de artefatos.

Pelo exposto, a redução universal no diâmetro das fibras do gastrocnêmico dos nossos ratos em carência alimentar corroboraria a impressão que temos, de que o comprometimento muscular na desnutrição não é fato isolado e, sim, parcela do envolvimento de toda a unidade motora. Justificariam esta posição as pesquisas de Sima²⁹

e de Platt e Stewart²⁶, nas quais o nervo periférico e a ponta anterior da medula, respectivamente, estão acometidos na desnutrição, com limitação do desenvolvimento. Portanto, ocorreria na privação protéica desde intra-útero, em linhas gerais, um retardo na diferenciação e desenvolvimento das fibras musculares e do 2º neurônio motor, concomitantemente.

A investigação dos estados hipoprotéicos e repercussões morfo-funcionais nos diversos tecidos poderá trazer importantes esclarecimentos quanto à etiopatogenia de várias doenças. Griggs e Rennie⁸ questionam se nas distrofias musculares ocorreria diminuição da síntese ou aumento da degradação de proteínas. Traçam interessante apreciação sobre este grupo de doenças em relação aos estados de desnutrição protéica no homem e no animal de experimentação. Consideram que, de fato, na distrofia de Duchenne existiriam algumas evidências de que a síntese protéica estaria diminuída. Em estudo anterior²¹, analisando as amiotrofias espinhais, chamaram-nos a atenção as fibras musculares de pequeno tamanho, do tipo fetal, encontradas em casos da doença de Werdnig-Hoffman. Dubowitz e Pearse⁷ descreveram que estas fibras apresentam forte reação à ATPase, fibras do tipo II. Em 1981, Dubowitz⁶ considera que, nesta afecção, ocorreria atrofia deste grupo de fibras. Parece-nos, entretanto, que poderíamos tomar em conta as nossas apreciações anteriores, levando-nos a admitir que não haveria atrofia na doença em apreço e, sim, hipoplasia destas fibras, resultante de alguma dificuldade na maturação de unidade motora. Em nossos animais, as fibras de menor calibre foram também as do tipo II. Deste modo, aventariamos se haveria alguma deficiência de amino-ácidos e/ou enzimas no metabolismo protéico dos setores lesados nesta doença.

A relação das propriedades fisiológicas e características de estrutura dos vários músculos vêm sendo estudadas^{2,12,13,25}. Tomando esta óptica, gostaríamos de considerar o interessante achado no que diz respeito à performance motora dos ratos investigados. Os hipoprotéicos revelaram-se mais ativos, mais ágeis, por vezes mais agressivos que os controles. Uma explicação para este desempenho seria o menor peso destes animais²³. Percebemos, todavia, menor resistência à fadiga. Um melhor entendimento dos fatos relatados neste trabalho virá, à medida que novos estudos morfo-funcionais forem estabelecidos.

REFERÊNCIAS

1. Benton JW, Moser HW, Dodge PR, Carr S — Modification of the schedule of myelination in the rat by early nutritional deprivation. *Pediatrics* 38:801, 1966.
2. Burke RE, Tsaris P — The correlation on physiological properties with histochemical characteristics in single muscle units. *Ann N Y Acad Sci* 228:145, 1974.
3. Chase HP, Dorsey J, McKhann GM — The effect of malnutrition on the synthesis of a myelin lipid. *Pediatrics* 40:551, 1967.
4. Chauhan S, Nayak NC, Ramalingaswami V — The heart and skeletal muscle in experimental protein malnutrition in Rhesus monkeys. *J Path Bact* 90:301, 1965.
5. Dastur DK, Manghani DK, Osuntokun BO, Sourander P, Kondo K — Neuromuscular and related changes in malnutrition: a review. *J Neurol Sci* 55:207, 1982.
6. Dubowitz V — Histochemical aspects of muscle disease. In Walton J (ed): *Disorders of Voluntary Muscles*. Ed 4. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981, pg 261.
7. Dubowitz V, Pearse AGE — Enzymic activity of normal and dystrophic human muscle: a histochemical study. *J Path Bact* 81:365, 1961.
8. Griggs RC, Rennie MJ — Muscle wasting in muscular dystrophy: decreased protein synthesis or increased degradation? *Ann Neurol* 13:125, 1983.
9. Haltia M, Berlin O, Schucht H, Sourander P — Post-natal differentiation and growth of skeletal muscle fibers in normal and undernourished rats: a histochemical and morphometric study. *J Neurol Sci* 36:25, 1978.
10. Hansen-Smith FM, Maksud MG, Van Horn DL — Effect of dietary protein restriction or food restriction on oxygen consumption and mitochondrial distribution in cardiac and red and white skeletal muscle of rats. *J Nutr* 107:525, 1977.
11. Hansen-Smith FM, Picou D, Golden MH — Growth of muscle fibers during recovery from severe malnutrition in Jamaican infants. *Br J Nutr* 41:275, 1979.
12. Hennaman E, Olson CB — Relations between structure and function in the design of skeletal muscles. *J Neurophysiol* 28:581, 1965.
13. Howells KF, Hulme JML, Jordan TC — Sex-related differences in the response of fast and slow muscle fibers to early undernutrition. *Res Exp Med (Berlin)* 176:137, 1979.

14. Howells KF, Mathews DR, Jordan TC — Effects of pre and perinatal malnutrition on muscle fibers from fast and slow rats muscles. *Res Exp Med (Berlin)* 173:35, 1978.
15. Kumar A, Ghai OP, Singh N — Delayed nerve conduction velocities in children with protein-calorie malnutrition. *J Pediatr* 90:149, 1977.
16. Madi K, Campos SD — Desnutrição experimental: resultados anátomo-patológicos e bioquímicos da administração de dietas hipoprotéicas a ratos albinos jovens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 73:153, 1975.
17. Madi K, De Paola D — Deficiências nutricionais. In De Paola D (ed): *Mecanismos Básicos de Doença*. Atheneu, Rio de Janeiro, 1977, pg 168.
18. Madi K, Jervis HR, Anderson PR, Zimmerman MR — A protein-deficient diet: effect on the liver, pancreas, stomach and small intestine of the rat. *Arch Path* 89:38, 1970.
19. Madi K, Takiya CM, Nogueira RS — Aspectos morfológicos do ecossistema intestinal: estudo evolutivo do complexo flora-mucosa. *An Microbiol (Rio de Janeiro)* 27:11, 1982.
20. Montgomery RD — Muscle morphology in infantile protein malnutrition. *J Clin Path* 15:511, 1962.
21. Nascimento OJM — Heredo-amiotrofias medulares progressivas. Tese. Rio de Janeiro, 1979.
22. Oldfors A, Mair WGP, Sourander P — Muscle changes in protein-deprived young rats: a morphometrical, histochemical and ultrastructural study. *J Neurol Sci* 59:291, 1983.
23. Oldfors A, Sourander P — Effects of training of skeletal muscle in protein-deprived rats. *J Neurol Sci* 69:1, 1985.
24. Onofre AF — Efeito da desnutrição aguda sobre o diafragma: estudo experimental em coelhos. Tese. Rio de Janeiro, 1987.
25. Oscar LB, Molé PA, Hollosky JO — Effects of exercise on cardiac weight and mitochondria in male and female rats. *Am J Physiol* 220:1944, 1971.
26. Platt BS, Stewart RJC — Effects of protein-calorie deficiency on dogs: 2. Morphological changes in the nervous system. *Develop Med Child Neurol* 11:174, 1969.
27. Racela AS Jr, Grady HJ, Higginson J, Svoboda DJ — Protein deficiency in Rhesus monkeys. *Am J Pathol* 49:419, 1966.
28. Sachdev KK, Taori GM, Pereira SM — Neuromuscular status in protein-calorie malnutrition. *Neurology* 21:801, 1971.
29. Sima A — Studies on fibre size in developing sciatic nerve and rehabilitated rats. *Acta Physiol Scand suppl* 406:1, 1974.
30. Singh RS, Agrawal SP, Dikshit SK — Serum enzymes in nutritional muscular wasting. *Indian J Pediatr* 39:383, 1972.
31. Stewart RJC, Preece RF, Sheppard HG — Twelve generations of marginal protein deficiency. *Br J Nutr* 33:233, 1975.
32. Wainio WW, Allison JB, Kremzner LT, Bernstein E, Aronoff M — Enzymes in protein depletion: III. Enzymes of brain, kidney, skeletal muscle and spleen. *J Nutr* 67:197, 1959.
33. Walsh G, DeVivo D, Olson W — Histochemical and ultrastructural changes in rat muscle. *Arch Neurol* 24:83, 1971.
34. Werneck LC — O valor da biópsia muscular em neurologia: análise de 290 exames a fresco e pela histoquímica. *Rev Bras Clin Terap* 10:2, 1981.