



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

PAULA BRIELLE PONTES SILVA

**IMPLICAÇÕES DO TRATAMENTO NEONATAL COM L-
TRIPTOFANO ASSOCIADO À GLICOSE NOS PARÂMETROS
MASTIGATÓRIOS EM RATOS JOVENS**

Recife

2018

PAULA BRIELLE PONTES SILVA

**IMPLICAÇÕES DO TRATAMENTO NEONATAL COM L-
TRIPTOFANO ASSOCIADO À GLICOSE NOS PARÂMETROS
MASTIGATÓRIOS EM RATOS JOVENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição
Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientador: Prof^o. Dr. Raul Manhães de Castro.

Coorientador: Prof^o. Dr. Ana Elisa Toscano e
Prof^a Dra Kelli Nogueira Ferraz Pereira Althoff.

Recife
2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586i Silva, Paula Brielle Pontes.
Implicações do tratamento neonatal com L-triptofano associado à glicose nos parâmetros mastigatórios em ratos jovens / Paula Brielle Pontes Silva. – 2018.
58 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Raul Manhães de Castro.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Plasticidade fenotípica. 2. Triptofano. 3. Mastigação. 4. 5-HT. 5. Ratos. I. Castro, Raul Manhães de (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (20. ed.) UFPE (CCS 2019-182)

PAULA BRIELLE PONTES SILVA

**IMPLICAÇÕES DO TRATAMENTO NEONATAL COM L-
TRIPTOFANO ASSOCIADO À GLICOSE NOS PARÂMETROS
MASTIGATÓRIOS EM RATOS JOVENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada em: 28/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Raquel da Silva Aragão (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Gisélia de Santana Muniz (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Tássia Karin Ferreira Borba (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho a meu filho, Arthur, e a minha mãe, Gabriela, .que me motivam a dar o melhor de mim a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS** por me guiar durante toda a minha vida, sempre me dando forças para seguir em frente, quando até eu achava que não conseguiria. Tudo é dEle, para Ele, por meio dEle são todas as coisas.

Aos meus pais, **Djane Gabriela do Rego Pontes** e **Genival Henrique Leite**, pelo seu amor incondicional, por acreditar em mim e me impulsionar para conseguir meus objetivos. Sem o esforço e empenho deles, não seria possível alcançá-los.

A minha avó, **Maria de Lourdes Matias Pontes**, que para mim é uma segunda mãe, sempre me dando suporte e amor. Aos meus grandes amigos, **Jefferson Thadeu Arruda Silva** e **Camila Caroline Carlini**, que nos momentos mais difíceis sempre estão lá pra me apoiar!

As estudantes de iniciação científica, **Mirelle** e **Beatriz**, pelo enorme empenho para realização das atividades do laboratório. Sem vocês não teria conseguido.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa: **Tassia Karin**, **Carolina Cadete**, **Thaynan Raquel**, **Jacqueline Silva**, **Barbara Santana**, **Henrique Gouveia**, **Manuella da Luz**, **André Terácio**, pelo companheirismo ao longo desses dois anos.

Ao meu orientador, **Raul Manhães de Castro**, por me ensinar grandes lições sobre a pesquisa e sobre a vida. As minhas co-orientadoras **Ana Elisa Toscano** e **Kelli Nogueira**.

Agradeço por todos os ensinamentos e pela paciência com minha pessoa. Aos docentes da Pós-graduação em Nutrição, em especial as professoras **Elizabeth Nascimento** e **Raquel Aragão**, sempre dispostas a ajudar.

As professoras **Gisélia Muniz** e **Lígia Galindo**, pelas preciosas contribuições durante o exame de qualificação.

Ao **Departamento de Nutrição**, pela estrutura e apoio para a realização do projeto.

Aos responsáveis pelo Biotério de criação do Departamento de Nutrição **Edeones França** e **Bruno**, pelos animais disponibilizados para a pesquisa. Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Agradecimentos especiais a:

Diego Cabral Lacerda, meu amigo pra vida toda.

Acredito que quando Deus realiza um sonho pra gente ele faz o serviço completo. Passar no mestrado parecia muito distante pra mim, interiorana, vinda de instituição particular... Consegui! E para me guiar nessa caminhada Deus me mandou esse anjo, que por muitas vezes me deu grandes lições de humildade, bondade e amor ao próximo. Muito obrigada por toda ajuda e atenção dada nesses dois anos. Pela competência científica e paciência em me ensinar tudo do zero, sem você não teria ido muito longe neste curso. Muito obrigada, principalmente, por todas as crises de riso, abraços, conselhos, gestos sinceros de amizade, por todas as vezes que cantamos “Baby, one more time”... Enfim, foram muitos os momentos em que você me fez sentir em casa. Muito obrigada por ser essa pessoa incrível! E “se esse mundo existe” quero continuar sua amiga pro resto da vida! Conta comigo pro que precisar.

Wesley Carvalho da Silva, esposo, companheiro, melhor amigo.

Não sei se mereço uma pessoa tão especial na minha vida, mas agradeço a Deus por ter você comigo. Esse ano nós completamos dez anos juntos e eu não consigo imaginar como teriam sido esses anos sem você. Muito obrigada por todo apoio, por todas as vezes que você me levantou quando eu caí, por me fazer acreditar que eu sou capaz quando nem eu tenho essa fé. Obrigada por todos os cafés, energéticos, massagens nas costas, refeições enquanto eu estudava. Obrigada por sua companhia, que muitas vezes em silêncio me diz muita coisa. Você largou tudo, mudou de cidade pra ficar comigo e me dar um conforto maior durante o mestrado, como eu vou ter palavras para agradecer por isso?! Mas é como você mesmo diz “estamos juntos pra todo tempo, toda hora...” e eu espero realmente retribuir todo esse amor que você me dá. Te amo pra sempre.

“O que ninguém viu nem ouviu, e o que jamais alguém pensou que poderia acontecer, foi isso que Deus preparou para aqueles que o amam. (BÍBLIA ONLINE, COR.2:9, 2011).

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração neonatal de L-triptofano (L-TRI) associado ou não à glicose sobre a eficiência mastigatória em ratos jovens. Foram utilizados 40 ratos Wistar machos, mantidos em condições padrão de biotério e distribuídos aleatoriamente entre os grupos: salina (S, n=10), glicose (G, n=10), triptofano salina (TS, n=10) e triptofano glicose (TG, n=10). Foram avaliados: ganho de peso corporal, os parâmetros motores da mastigação, consumo de ração durante a análise mastigação, propriedades musculares (peso e tipagem de fibras musculares) do feixe superficial do músculo masseter e dimensões mandibulares (base, altura e área da mandíbula). O grupo TG apresentou menor peso corporal que todos os outros grupos, maior período de mastigação rítmica que os grupos S e G e maior número de ciclos mastigatórios quando comparado ao grupo S. O grupo TS realizou mais sequências mastigatórias que o grupo S e teve menor período de incisão que os grupos S e G. Animais dos grupos TS e TG apresentaram maior peso do músculo masseter que os grupos S e G. Houve menor proporção de fibras tipo IIa e aumento das fibras IIb no grupo TS comparado ao grupo S e no grupo TG comparado aos grupos S e G. O L-triptofano isolado ou associado à glicose melhora a eficiência mastigatória e modifica o fenótipo das fibras musculares mastigatórias.

Palavras-chave: Plasticidade fenotípica. Triptofano. Mastigação. 5-HT. Ratos.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the effects of neonatal administration of L-tryptophan (L-TRI) in association or not with glucose on masticatory efficiency in young rats. 40 Wistar rats were randomly divided into groups and used: Saline (S, n=10), L-Tryptophan + Saline (TS, n=10), Glucose (G, n=10) and L-tryptophan + Glucose (TG, n=10). Animals were kept under standard animal husbandry conditions. We evaluated in the different groups: body weight gain, the motor parameters of mastication, muscle typing of the masseter and mandibular dimensions. The TG group showed reduction in body weight, higher duration of rhythmic mastication period and most number of masticatory cycles. The TS group made more masticatory sequences than the S group and had lower duration of incision period than the S and G groups. Animals of TS and TG groups increased muscle weight and the proportion of type IIA muscle fibers than the S and G groups. The treatment with L-tryptophan in association or not to glucose increases masticatory efficiency in young rats.

Keywords: Phenotypical plasticity. Tryptophan. Mastication. 5-HT. Rats.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
3	HIPÓTESE	23
4	OBJETIVOS	24
4.1	OBJETIVO GERAL.....	24
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5	METODOLOGIA	25
5.1	TIPO E LOCAL DO ESTUDO E QUESTÕES ÉTICAS	25
5.2	ANIMAIS.....	25
5.3	DELIMITAÇÃO DOS GRUPOS E DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
5.4	MENSURAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	27
5.5	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MOTORES DA MASTIGAÇÃO....	27
5.6	DIMENSÕES MANDIBULARES.....	29
5.7	EXTRAÇÃO E ANÁLISE MORFOLÓGICA DO FEIXE SUPERFICIAL DO MUSCULO MASSETER.....	29
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
6	RESULTADOS	32
6.1	PESO CORPORAL.....	32
6.2	PARÂMETROS MOTORES DA MASTIGAÇÃO.....	33
6.2.1	Número de sequencias da mastigação	33
6.2.2	Duração do período de incisão	33
6.2.3	Duração do período de mastigação rítmica	34
6.2.4	Número de ciclos mastigatórios	35
6.2.5	Frequência mastigatória	36
6.2.6	Consumo alimentar durante teste da mastigação	37
6.2.6.1	Absoluto.....	37
6.2.6.2	Relativo ao tempo de mastigação.....	38
6.3	PROPRIEDADES MUSCULARES.....	39
6.3.1	Peso do feixe superficial do musculo masseter	39
6.3.2	Peso do feixe superficial do musculo masseter relativo ao peso corporal	40

6.3.3	Distribuição das fibras musculares do feixe superficial do músculo masseter.....	41
6.4	DIMENSÕES MANDIBULARES.....	42
7	DISCUSSÃO	44
8	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO CEUA UFPE.....	58

1 INTRODUÇÃO

A mastigação é a primeira etapa do processo digestivo nos mamíferos (LUND, 1991). Esta complexa função biomecânica ocorre através de movimentos rítmicos que envolvem diversas estruturas, como músculos orofaciais, mandíbula e articulações têmporo-mandibulares, finamente controlados pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (YADAV, 2011). Uma mastigação eficiente depende não somente da integridade das estruturas orofaciais envolvidas nesse processo, como também da interação harmônica entre seus constituintes fisiológicos centrais e periféricos (YADAV, 2011).

Em mamíferos, a maturação das estruturas orofaciais é completada durante a gestação e primeira infância, período no qual ocorre grande plasticidade (WESTNEAT; HALL, 1992). Esta fase corresponde também ao período de maior desenvolvimento cerebral (WHITAKER-AZMITIA, 2010). Durante este período crítico, ocorrem diversos eventos biológicos de maturação, migração e diferenciação neuronal no cérebro, concomitantemente a processos de sinalização celular para o desenvolvimento craniofacial (JACOBS; AZMITIA, 1992; MOISEWITSCH, 2000). A alta plasticidade torna o período perinatal uma janela para a adaptação fenotípica no sistema nervoso central, bem como nas células alvo (BARKER et al., 2002). Deste modo, estímulos ambientais nas primeiras fases da vida podem gerar alterações fenotípicas sobre a mastigação em longo prazo.

Dentre os fatores relacionados à plasticidade durante o período crítico, destaca-se a serotonina (5-hidroxi-triptamina) (AZMITIA, 2007). Esta monoamina é sintetizada através do precursor triptofano (FERNSTROM, 2013). A taxa de síntese de serotonina é sensível aos níveis cerebrais de triptofano, e a captação cerebral deste aminoácido é mediada por transportadores competitivos na barreira hematoencefálica (LENARD; DUNN, 2005). A ingestão de carboidratos simples favorece a entrada do triptofano no cérebro e a síntese de serotonina, através da mobilização dos aminoácidos neutros que competem pelos transportadores cerebrais (FERNSTROM; et al., 1979). Assim, especula-se que a associação entre triptofano e glicose aumenta a biodisponibilidade cerebral do triptofano e favorece a sua conversão em serotonina.

Este neurotransmissor é descrito como molécula importante na regulação da ontogenia e desenvolvimento do sistema nervoso central bem como das estruturas craniofaciais (AZMITIA, 2007; LAUDER, 1978; SHUEY, 1992; MOISEWITSCH, 2000). Durante o período perinatal, possui ação indutora na proliferação e morfogênese tecidual, diferenciação neuronal, migração celular, expressão de fatores de crescimento, adesão celular e extracelular (LAUDER, 1990). Todos esses efeitos foram expressos em diversas áreas do corpo inclusive no epitélio e mesênquima da região craniofacial. A 5-HT participa ainda da regulação do ritmo mastigatório, fundamental para uma mastigação eficiente (REN et al., 1999).

Até o momento, estudos experimentais analisando os efeitos da manipulação serotoninérgica sobre a mastigação ainda são escassos. Embora hajam estudos avaliando a eficiência da mastigação e morfologia das estruturas orofaciais (FERRAZ-PEREIRA et al., 2015; LACERDA et al., 2017), pouco se sabe sobre os efeitos da administração neonatal de L-triptofano sobre tais parâmetros, tampouco sobre o papel da associação entre L-triptofano e glicose na função mastigatória. Ademais, uma mastigação eficiente está diretamente ligada a nutrição adequada, tornando esse objeto de estudo ainda mais importante. Desse modo a presente pesquisa objetivou analisar a influência do tratamento neonatal com L- triptofano associado ou não à glicose sobre a eficiência mastigatória em ratos jovens.

2 REVISÃO DE LITERATURA

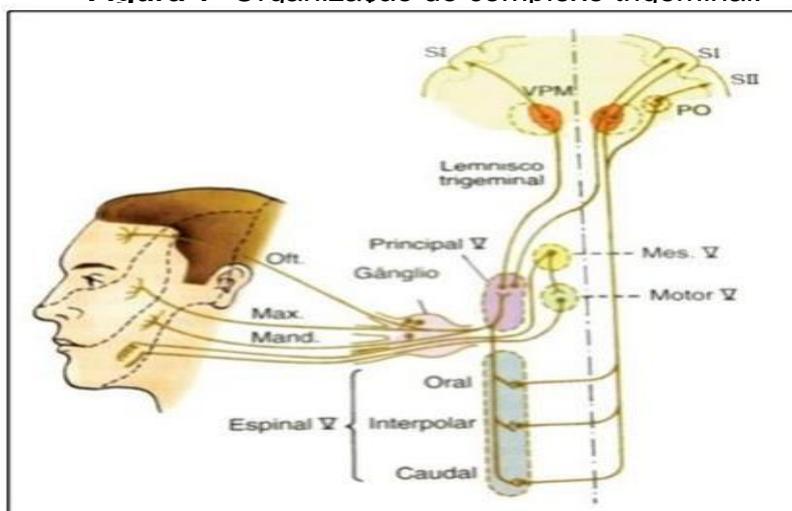
A mastigação compreende uma série de processos mecânicos e enzimáticos, que permite a trituração do alimento e formação do bolo alimentar (MOISEIWITSCH, 2000). Este processo marca o início da digestão e atua como gatilho para a secreção de hormônios e enzimas digestivas (ZHU et al., 2013). Além disso, participa da ativação de cascatas neuroendócrinas que permitem uma digestão eficiente e sinalização da saciedade (ZHU et al., 2013). Ademais, o ato de mastigar propicia estímulos mecânicos para a mandíbula, o ligamento periodontal e articulação têmporo-mandibular (ATM), estimulando o crescimento e desenvolvimento orofacial (MCNEILL, 2000).

Trata-se de um processo rítmico, que em ocorre em três etapas: Incisão, trituração e pulverização (BIANCHINI, 2005). Na primeira fase ocorre a captação e propulsão do alimento para as regiões oclusais dos dentes posteriores (DOUGLAS; ONCINS, 2011). Na fase seguinte, ocorre a trituração do alimento a partir de movimentos vigorosos, periódicos e de velocidade da mandíbula, denominados de ciclos mastigatórios (BIANCHINI, 2005). Na fase de pulverização, o alimento é transformado em bolo alimentar e os movimentos mandibulares são menores em amplitude (DOUGLAS; ONCINS, 2011). Para fins de análise em roedores, a mastigação é dividida em dois períodos (MOSTAFEEZUR et al., 2012). O período de incisão é caracterizado por sucessivas incisões e da condução do alimento para a parte posterior da cavidade oral, quando se inicia o período da mastigação rítmica (MOSTAFEEZUR et al., 2012). No período da mastigação rítmica iniciam-se os ciclos mastigatórios, a trituração e a pulverização do alimento (MOSTAFEEZUR et al., 2012).

A eficiência mastigatória pode ser definida como a capacidade de captar e triturar o alimento adequadamente (VAN DER BILT, 2002). Os parâmetros motores da função mastigatória (duração do período de incisão e da mastigação rítmica, número de ciclos mastigatórios, número de sequências mastigatórias e frequência mastigatória), são considerados indicadores do desempenho no processamento alimentar, sendo, portanto eficazes em avaliar o grau da eficiência mastigatória (MOSTAFEEZUR et al., 2012).

A função mastigatória é desempenhada por órgãos periféricos, estímulos sensoriais e sistema nervoso central (DOUGLAS, 2002). No SNC, as atividades sensoriais e motoras da mastigação são controladas principalmente pelo ramo mandibular do nervo trigêmeo (AIRES, 2012). O complexo trigeminal é formado pelos núcleos sensorial principal, mesencefálico, motor e espinal (Figura 1) (AIRES, 2012). No tronco encefálico, o padrão rítmico da mastigação é controlado pelo gerador de padrão central (CPG) (LUND; KOLTA, 2006). O CPG possui conexões com várias áreas do complexo trigeminal, incluindo os núcleos motores trigeminal (NVmot) e facial (NIII), além do núcleo principal sensorial do trigêmeo (NVsnpr) (Figura 1) (LUND, KOLTA 2006). Cada neurônio de saída do CPG possui um conjunto de conexões com motoneurônios, que também recebem feedback sensorial (KOLTA et al., 2006). Assim, o NVsnpr recebe os estímulos sensoriais táteis da área cortical da mastigação e envia os disparos para o Nvmot (YOSHIDA et al., 1998). O núcleo mesencefálico recebe estímulos sensoriais proprioceptivos dos músculos mastigatórios e ligamentos peridontais (MASCARO et al., 2008) (Figura 1). Diante dos diferentes estímulos sensoriais recebidos, o Nvmot controla o tônus muscular dos músculos mastigatórios, o ritmo da mastigação e a força da mordida (MASCARO et al., 2008). Nesse contexto, uma mastigação eficiente depende não somente da integridade das estruturas orofaciais envolvidas nesse processo, como também da interação harmônica entre seus constituintes fisiológicos centrais e periféricos (YADAV, 2011).

Figura 1- Organização do complexo trigeminal.



Fonte: Aires, 2012.

O controle da função mastigatória, bem como a morfologia das estruturas envolvidas nesse processo são sensíveis aos estímulos ambientais. Essa habilidade de um único genótipo de produzir mais de uma forma de morfologia, estado fisiológico e/ou comportamento, em resposta a condições ambientais é chamada de Plasticidade Fenotípica (WEST-EBERNARD, 1989). As fases intra-uterina e neonatal são consideradas janelas para a adaptação biológica (BARKER et al., 2002). Nestes períodos ocorrem importantes diferenciações fenotípicas e morfofisiológicas, que permitem a adaptação ao ambiente frente as condições ambientais (HANSON; GLUCKMAN, 2008). Durante os períodos críticos do desenvolvimento ocorre alta proliferação e migração celular (BARKER et al., 2002). Assim, o organismo torna-se mais sensível a fatores ambientais nestas fases (HANSON; GLUCKMAN, 2008).

O conjunto de mecanismos envolvidos nesta plasticidade é chamado de epigenética (AGUILERA et al., 2010). Os processos epigenéticos são gerados através da mudança no epigenoma e expressão gênica em resposta a estímulos ambientais, sem nenhuma alteração na sequência do DNA (WELLS, 2010). A plasticidade do desenvolvimento é termo chave para compreender os mecanismos pelos quais o ambiente influencia na expressão fenotípica (BARNES, 2016). O campo que estuda esta plasticidade e suas consequências na vida adulta é conhecido como “Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD)” (HANSON, 2015). O DOHaD enfatiza que um mesmo estímulo ambiental pode gerar impactos diferentes na plasticidade, dependendo do período em que ocorre (WADHWA et al., 2009). Assim, as alterações epigenéticas que ocorrem durante o período de desenvolvimento embrionário têm maior impacto do que a fase adulta, devido suas consecutivas divisões mitóticas (AGUILERA et al., 2010).

O conceito de DOHaD é resultante da união de vários estudos, que sugeriram que o período de desenvolvimento fetal pode sofrer influencias ambientais, alterando a susceptibilidade para doenças futuras (SCHMIDT; BURACK; VAN LIESHOUT, 2016). Nesse contexto, a associação entre predisposição genética e estímulo ambiental causa adaptações epigenéticas que geram consequências na vida adulta (GLUCKMAN; HANSON, 2011). Esta programação epignética permite

que os indivíduos se adaptem a mudanças nas condições ambientais e aumentem suas chances de sobrevivência (SKINNER et al., 2010).

Durante este período de alta plasticidade, ocorre a maturação das estruturas chave da mastigação (MOISEWITSCH, 2000). Estas incluem músculos, ossos, vasos e nervos (LAKARS; HERRING, 1980). Em humanos este período vai do terceiro trimestre gestacional e vai até os dois a quatro anos de vida (MORGANE, 1978). Já em ratos este desenvolvimento ocorre durante embriogênese até o final do período de desmame (MORGANE, 1978). Somente após o período de maturação do complexo craniofacial se tem o completo desenvolvimento do padrão mastigatório (LAKARS; HERRING, 1980).

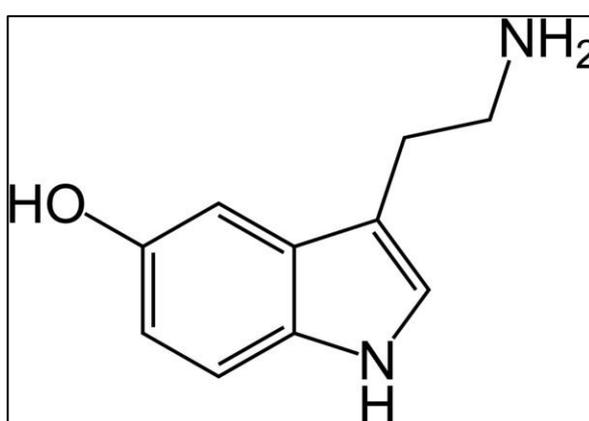
O período de desenvolvimento do complexo craniofacial ocorre concomitantemente ao período crítico de maturação do sistema nervoso central (WESTNEAT; HALL, 1992). Este desenvolvimento é caracterizado pela formação de diversas conexões neuromusculares na região orofacial e no SNC (HERRING, 1985). Ademais, são observadas mudanças ontogenéticas na mandíbula e músculos mastigatórios à medida que a mastigação é aprendida (NAKATA, 1981). Nos músculos mastigatórios (masseter, digástrico e supra-hióide) observa-se uma mudança no padrão de fibras musculares, quando a sucção é substituída pela mastigação (KOGO; FUNK; CHANDLER, 1995). A proporção na composição de fibras de miosina tipo IIB (MyHC2B), de contração rápida e alta força de contração, aumenta (SHIDA, 2005). Esta adaptação permite a realização dos movimentos rítmicos e vigorosos durante os ciclos mastigatórios (SHIDA, 2005).

Já o desenvolvimento mandibular tem início a partir do 4^o mês de vida intrauterina (MOYERS, 1988). Durante a gestação ocorre a ossificação intramembranosa da mandíbula (exceto na região condilar) (TOLEDO, 1996). Durante a lactação (a partir dos 6 a 8 meses até os dois anos de vida posnatal), ocorre o primeiro pico de crescimento mandibular, por remodelação óssea (CORREIA, 1998). Neste período, a morfologia do tecido ósseo mandibular e a cartilagem condilar apresentam maior vulnerabilidade a mudanças ambientais (TOLEDO, 1996).

O sistema serotoninérgico é um dos principais sistemas de neurotransmissão envolvidos no desenvolvimento das estruturas orofaciais (JACOBS; AZMITIA, 1992). Este sistema está relacionado a uma grande diversidade de funções (JACOBS;

AZMITIA, 1992). A amina biogênica 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina atua como neurotransmissor, além de fator trófico de tecidos neurais e não neurais (LAUDER, 1988). A 5-HT é uma indolamina (figura 2), formada por um anel indol e uma cadeia lateral carboxil-amida (LAM et al., 2010). Cerca de 90% da serotonina corporal é produzida nas células enterocromafins do trato gastrointestinal (VEDOVATO et al., 2014). No SNC, é sintetizada no núcleo da rafe a partir do aminoácido aromático essencial triptofano (ROSSI; TIRAPEGUI, 2004).

Figura 2 - Estrutura química da serotonina



Fonte: ROSSI; TIRAPEGUI, 2004.

Como neurotransmissor, a 5-HT atua em várias regiões cerebrais e influencia diversos processos relacionados à memória e ao aprendizado, sono, comportamento alimentar, (FEIJO; BORTULUCI; REIS, 2010; SHABBIR et al., 2013), a depender dos tipos de receptores envolvidos (LAUDER, 1990). Ao todo são conhecidos 7 classes de receptores de 5-HT e 14 subtipos (HOYER; HANNON; MARTIN, 2002).

Durante a gestação, a placenta fornece a 5-HT necessária a formação do sistema serotoninérgico em desenvolvimento (BONNIN et al., 2011). Os primeiros neurônios serotoninérgicos aparecem no tronco encefálico humano a partir da quinta semana de vida intrauterina (SUNDSTRON et al., 1993). No rato, este período corresponde entre o 10º e 12º dia de vida intrauterina (SULLIVAN, 2011). A partir deste período, os neurônios serotoninérgicos migram do núcleo da rafe e modulam o desenvolvimento de várias regiões cerebrais, como o hipotálamo, o córtex cerebral e o núcleo do trato solitário (NTS) (GASPAR et al., 2003; MORTON et al., 2006). A 5-

HT desempenha papel importante nas fases do desenvolvimento cerebral, modulando a divisão celular, migração neuronal, diferenciação das células e sinaptogênese (GASPAR et al., 2003; AZMITIA, 2001).

A serotonina também participa do desenvolvimento embrionário de tecidos não neurais (JACOBS; AZMITIA, 1992). Ademais, regula a expressão de fatores de crescimento, adesão celular e extracelular (LAUDER, 1990). Esses estímulos ocorrem em diversas áreas do corpo inclusive no epitélio e mesênquima da região craniofacial (LAUDER, 1990; MOISEWITSCH, 2000).

O aumento dos níveis de serotonina na fenda sináptica parece contribuir no desenvolvimento de parâmetros que refletem a integridade do sistema estomatognático (RIBEIRO-DO-VALLE, 1997). Dessa forma, tanto a morfogênese das estruturas crânio-faciais, dentais e musculares do sistema estomatognático; bem como a regulação dos movimentos rítmicos de abertura e fechamento da mandíbula, tem a participação de sistemas de neurotransmissores, sobretudo da 5-HT (RIBEIRO-DO-VALLE, 1997). Além disso, a serotonina desempenha importante papel na formação da crista neural, bem como na elevação do palato, na invaginação do dente no estágio de botão e condensação da papila dental, através da proliferação e diferenciação realizada por receptores de superfície celular e sua transdução de sinal associados (MOISEWITSCH, 2000). Tecidos da região oral, como linha do palato, língua, proeminências maxilares e mandibulares e papila dental também possuem receptores serotoninérgicos durante o período ativo de morfogênese, podendo ser indício da atuação da serotonina como moduladora desse evento. (LAUDER, 1988). Receptores serotoninérgicos com características semelhantes àqueles encontrados em neurônios maduros também foram observados *in vitro* no epitélio da face, cavidade oral, e cérebro em desenvolvimento (LAUDER, 1988).

Entre os diversos receptores serotoninérgicos, o 5-HT_{2B} é um dos mediadores chaves da ação da serotonina durante o desenvolvimento. De acordo com Reisoli et al (2010), a sinalização do receptor 5-HT_{2B} é necessária para modular a forma e a função de diversos elementos esqueléticos da mandíbula e a ATM. Estudos demonstraram que os osteoblastos e osteócitos de ratos sintetizam a 5-HT, além de expressar receptores e transportadores serotoninérgicos. Estudo recente realizado *in vitro* observou que as células ósseas expressam a enzima

triptofano hidroxilase, que catalisa a conversão do triptofano em serotonina (BLIZIOTES et al., 2001; BLIZIOTES et al.; 2006). A presença da serotonina nas células ósseas está relacionada a maior produção de matriz óssea, através da diminuição da reabsorção e/ou aumento da deposição óssea. Assim, este ocorre aumento na massa e densidade óssea mineral na presença da 5-HT (GUSTAFSSON et al., 2006). A 5HT participa ainda da regulação do ritmo mastigatório através da estimulação do complexo sensorio-motor trigeminal e o núcleo caudal da rafe (DELLOW; LUND, 1971).

Através do núcleo da rafe pálido e obscuro, neurônios serotoninérgicos enviam projeções para o núcleo motor trigeminal, estimulando a despolarização e excitabilidade celular durante a atividade mastigatória (RIBEIRO- DO-VALE et al., 2001; HSIAO et al., 2005). Estudos experimentais apontam aumento da excitabilidade de membrana e das descargas nos neurônios motores trigeminais durante os ciclos mastigatórios (HSIAO, 1997; HSIAO, 2005).

A exposição a fármacos inibidores da recaptção de serotonina (ISRS) promovem aumento deste neurotransmissor na fenda sináptica, inibindo o transportador de serotonina (SERT) (PINHEIRO et al., 2017a). O padrão dietético também é um dos fatores determinantes do aumento dos níveis de serotonina (HUETER et al., 2016).

Estudos experimentais associaram a desnutrição protéica perinatal ao aumento dos níveis de serotonina (MANJARREZ et al., 1994; PINHEIRO et al., 2017b). Segundo Hueter e colaboradores (2016), os mecanismos de aumento da 5HT mediante desnutrição neonatal envolvem o aumento da disponibilidade cerebral de triptofano. Resnick e Morgane (1983), ao realizar protocolo experimental de desnutrição protéica neonatal em ratos, também observaram aumento dos níveis de serotonina, ácido hidroxindolacético e triptofano.

O aminoácido triptofano (TRP) é um dos principais precursores da serotonina (5-HT) (LESNIAK et al., 2013). Este aminoácido essencial pode ser obtido pela alimentação rica em alimentos protéicos, como ovos, leite, carne e soja. Sua metabolização segue um processo complexo que conduz à geração de vários compostos neuroativos, em destaque a 5-HT (CHEN; GUILLEMIN, 2009). Em virtude deste aminoácido interferir sobre os níveis de 5-HT, estudos experimentais têm utilizado o L-TRI, como um método eficaz, não farmacológico e não invasivo para

manipulação do sistema serotoninérgico (MATEOS et al., 2009; ESTEBAN et al., 2004).

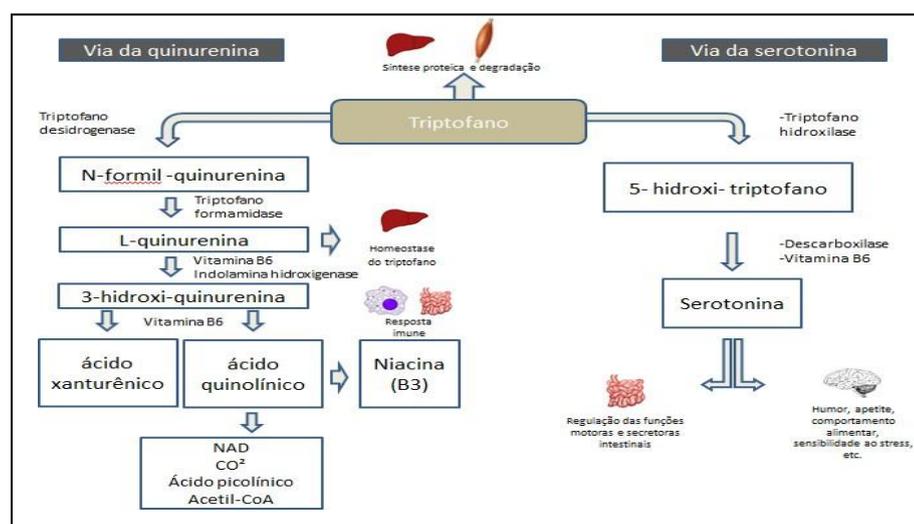
A síntese de 5-HT envolve várias etapas (figura 1). Inicialmente o L-TRI é hidroxilado e convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela ação da triptofano hidroxilase (SILVA et al., 2017). Em seguida, o 5-HTP é descarboxilado, a partir da enzima 5- hidroxitriptofano descarboxilase, dando origem a 5-HT (SILVA et al., 2017). A degradação da 5-HT é feita pelas enzimas monoaminoxidase (MAO) e aldeído desidrogenase (ALDH), tendo como produto final o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (FERNSTROM, 1991).

No plasma, cerca de 80% triptofano circula conjugado à albumina, para otimizar o transporte pela barreira hematoencefálica (LE FLOC´H; OTTEN; MERLOT, 2011). Assim, álcool, drogas, desnutrição protéica, entre outros fatores que causem hipoalbuminemia podem levar a diminuição da biodisponibilidade de triptofano (LE FLOC´H; OTTEN; MERLOT, 2011).

As principais vias metabólicas do triptofano são a via das quinureninas e a via da serotonina, respectivamente (LESNIAK et al, 2013). O triptofano também é utilizado na síntese protéica, porém em menor proporção, devido a sua baixa disponibilidade (LESNIAK et al., 2013).

A figura 3 descreve resumidamente as principais vias metabólicas do triptofano.

Figura 3 - Principais vias metabólicas do triptofano



Fonte: Adaptado de Le Floch; Otten; Merlot, 2011.

Estima-se que 95% do triptofano absorvido sejam metabolizados pela via das quinureninas, 4% a 6% sofra degradação bacteriana no intestino e apenas 1% a 2% seja convertido em serotonina (LE FLOCH; OTTEN; MERLOT, 2011).

A quantidade de triptofano que será convertida em serotonina depende não somente da concentração plasmática de TRP, mas também do balanço entre o triptofano e outros aminoácidos neutros, como tirosina e fenilalanina (FERNSTRON; WURTMAN, 1979).

Deste modo, a concentração plasmática dos aminoácidos neutros torna-se fator importante na conversão do triptofano em serotonina (FERNSTRON; WURTMAN, 1979), uma vez que estes aminoácidos têm vantagem na competição pela entrada na barreira hematoencefálica (LESNIAK et al., 2013).

A associação do triptofano a carboidratos simples também parece favorecer a conversão deste aminoácido em serotonina, pois o aumento da glicose diminui a concentração de aminoácidos livres na barreira hematoencefálica (FERNSTRON; WURTMAN, 2013). Isso ocorre devido a liberação de insulina provocada pelo carboidrato, que favorece a saída destes aminoácidos para os músculos, diminuindo a competição nos transportadores da barreira hematoencefálica, favorecendo a passagem do L-triptofano na barreira e conversão em serotonina (ROSSI; TIRAPEGUI, 2004).

Diante da escassez de estudos avaliando a função mastigatória mediante tratamento neonatal com L-triptofano, torna-se pertinente avaliar os efeitos da modulação do sistema serotoninérgico sobre a eficiência mastigatória. Além do mais, dada a baixa disponibilidade do triptofano dietético, faz-se necessário aprimorar as maneiras de tornar este aminoácido mais biodisponível para conversão em 5HT. Diante do exposto, o presente estudo avaliou os efeitos do L-triptofano em associação ou não a glicose sobre os parâmetros motores da mastigação e maturação das estruturas orofaciais (feixe superficial do músculo masseter e mandíbula).

3 HIPÓTESE

A administração neonatal ao L-triptofano, associado ou não à glicose, melhora a eficiência mastigatória em ratos jovens.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar a influência do tratamento neonatal com L- triptofano associado ou não à glicose na eficiência mastigatória em ratos jovens.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar, em animais submetidos ao tratamento neonatal com L-triptofano em associação ou não à glicose:

- O ganho de peso corporal dos filhotes;
- Os parâmetros motores da função mastigatória (duração do período de incisão, duração do período da mastigação rítmica, número de ciclos mastigatórios, frequência mastigatória e consumo alimentar durante a análise da mastigação);
- O peso e distribuição dos tipos de fibras do feixe superficial do músculo masseter;
- As dimensões mandibulares (base, altura e área da mandíbula);

5 METODOLOGIA

5.1 TIPO E LOCAL DO ESTUDO E QUESTÕES ÉTICAS

O presente estudo possui caráter experimental quantitativo e foi realizado no laboratório do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, processo nº 0038/2016 (ANEXO A). Os experimentos foram iniciados e realizados seguindo as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), de acordo com a lei 11.794 de 8 de Outubro de 2008.

5.2 ANIMAIS

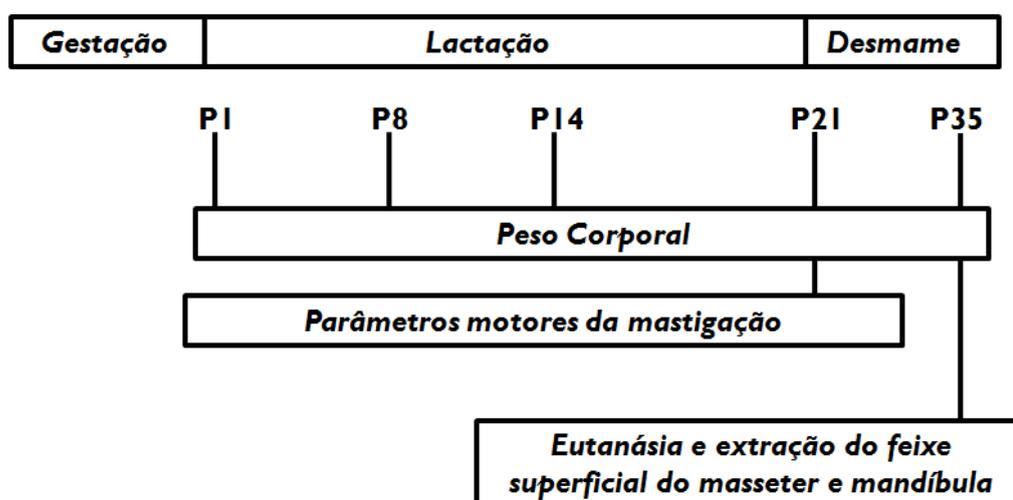
Foram utilizados 40 filhotes machos de ratos da linhagem Wistar (espécie *Rattus Novergicus Albinus*), obtidos através de 15 ratas Wistar adultas provenientes do biotério de criação do Departamento de Nutrição da UFPE. A escolha das progenitoras obedeceu aos seguintes critérios de inclusão: ratas entre 90 e 120 dias de vida, não parentes, primíparas, com peso entre 220g e 250g, para evitar quaisquer influencias genéticas e/ou fisiológicas nos filhotes gerados (ZAMBRANO et al., 2006). Foi realizado o acompanhamento do ciclo estral das ratas progenitoras, a fim de identificar seu período fértil para acasalamento, através da técnica de esfregaço vaginal (MARCONDES et al., 2002).

Logo após o nascimento, os filhotes foram distribuídos aleatoriamente em ninhadas de oito filhotes por mãe. Em casos de ninhadas com mais de oito animais, foram priorizados os filhotes machos para compor os grupos. Alguns filhotes do sexo feminino foram utilizados para padronização das ninhadas quando estas possuíam menos de oito filhotes do sexo masculino. Apenas os filhotes machos foram submetidos aos experimentos e obtenção de resultados. Os animais foram mantidos no Biotério de experimentação do Departamento de Nutrição da UFPE com temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas, alojados em gaiolas de polipropileno com dimensões 46 x 31 x 21 cm (CxLxA), com livre acesso à água e alimentação.

5.3 DELIMITAÇÃO DOS GRUPOS E DESENHO EXPERIMENTAL

Os filhotes foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, de acordo com o tratamento recebido (Figura 4). As ninhadas foram subdivididas de forma que dois animais pertencessem a cada grupo experimental, totalizando oito animais por ninhada. Até o final do período de lactação (21 dias), os filhotes ficaram nas gaiolas com suas mães. Durante esse período, cada grupo recebeu um tratamento diferente, diariamente, via subcutânea dorsal (tabela 1), uma hora após o início do ciclo escuro (às 09h). Nesse horário ocorre o pico de liberação de 5-HT no hipotálamo (MATEOS et al., 2009).

Figura 4 - Fluxograma do desenho experimental, destacando a ordem cronológica das etapas realizadas no estudo.



Fonte: elaborado pela autora.

Foram utilizadas solução salina, (NaCl 0.9%, 1µl/g) solução de glicose (C₆H₁₂O₆ 5%, 1µl/g), solução salina + triptofano (100mg/kg, 1µl/g), solução de glicose + triptofano (100mg/kg, 1µl/g) (Tabela 1). O triptofano (L- TRI) foi diluído na solução glicosada ou salina. A quantidade utilizada foi previamente estabelecida através de estudo de relação dose-efeito (CARVALHO-SANTOS et al., 2010).

Tabela 1 - Delimitação dos grupos experimentais, de acordo com a substância administrada.

Solução salina	Solução salina + Solução de glicose + Triptofano	Solução de glicose + Triptofano
- Grupo Salina (S, n=10)	- Grupo Triptofano Salina (TS, n=10)	- Grupo Glicose (G, n=10) - Grupo Triptofano Glicose (TG, n=10)

Fonte: elaborada pela autora.

Findado o período de lactação, os animais foram separados de suas mães e colocados em gaiolas com 3 ou 4 animais de mesmo grupo experimental e mantidos em dieta padrão até os 35 dias de vida. Os testes dos parâmetros motores da mastigação foram avaliados no dia P21. Passados os 35 dias, os animais foram eutanasiados através de decapitação. Após o sacrifício, as mandíbulas foram retiradas e medidas e foram extraídos os feixes superficiais do músculo masseter esquerdo.

5.4 MENSURAÇÃO DO PESO CORPORAL

O peso corporal dos filhotes foi verificado no 1º, 8º, 14º, 21º e 35º dia de vida pós-natal, para acompanhamento da taxa de crescimento desses animais. A pesagem foi feita a partir de uma balança eletrônica digital (Marte, modelo S-1000, capacidade de 1 Kg e sensibilidade de 0,1g).

5.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MOTORES DA MASTIGAÇÃO

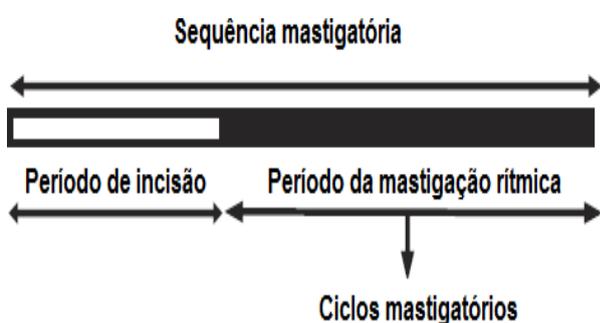
Os animais foram submetidos à análise dos parâmetros motores da função mastigatória no 21º dia de vida, de acordo com o protocolo de Ferraz-Pereira e colaboradores (2015). Os animais passaram por um período de 3 horas em privação alimentar. O início do jejum foi realizado individualmente com o intervalo de meia hora entre cada animal, a fim de manter o mesmo tempo de jejum para todos os animais. Após o período de privação alimentar, os animais foram alocados individualmente em uma gaiola de acrílico transparente. No início da avaliação, foi

colocado dentro da gaiola aproximadamente 1 grama de pequenos fragmentos de pellets de ração padrão de biotério para cada animal. Posteriormente à análise, estes fragmentos foram pesados novamente.

A ingestão alimentar foi obtida pela diferença do peso da ração antes e após a observação comportamental. Os animais foram filmados por 15 minutos enquanto se alimentavam, utilizando uma câmera (Sony DCR-DVD610 NTSC). De cada vídeo foram analisados três períodos de 30 segundos. A escolha desses períodos foi baseada na observação do momento em que o animal realizou os movimentos mastigatórios de forma contínua. Além disso, também foi levada em consideração, a qualidade de imagem observada lateralmente.

Por meio da análise das sequências mastigatórias, os seguintes parâmetros foram avaliados (Figuras 5 e 6): *Duração do período de incisão* (período inicial caracterizado por sucessivas incisões); *Duração do período de mastigação rítmica* (período marcado pela execução dos ciclos mastigatórios); *Número de ciclos mastigatórios* (quantidade de movimentos verticais de abertura e fechamento da mandíbula); *Número de sequências mastigatórias*; *Frequência mastigatória* (quantidade de ciclos mastigatórios realizados por segundo).

Figuras 5 e 6 - Esquema representativo dos parâmetros motores da mastigação (figura 5). Observação do animal no plano sagital por meio da filmagem para extração dos parâmetros avaliados (figura 6)



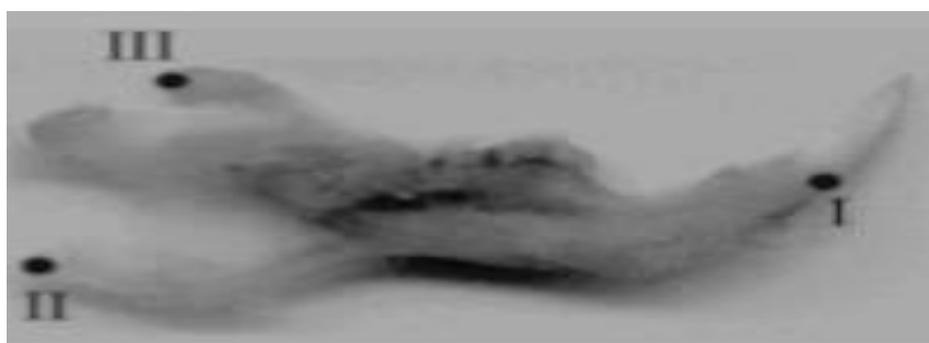
Fonte: Resultados da pesquisa.

Para quantificação de tais parâmetros, os vídeos foram analisados por um avaliador cego para a identidade do animal, e vistos em *slow-motion*, (redução de 90% da velocidade), utilizando o programa de reprodução de vídeos *Media Player Classic Home Cinema* (versão 1.7.5).

5.6 EXTRAÇÃO E MEDIDAS DAS DIMENSÕES MANDIBULARES

No dia P35, após decapitação dos animais, foi seguido o protocolo de Alippi e cols. (2002), de extração e medidas das dimensões mandibulares. A mandíbula foi extraída, limpa, cortada ao meio na linha da sutura média. A porção esquerda da mandíbula foi medida, utilizando um paquímetro.

Figura 7 - Aspectos da mandíbula esquerda após secção, evidenciando os pontos de mensuração.



Fonte: Alippi et al., 2002.

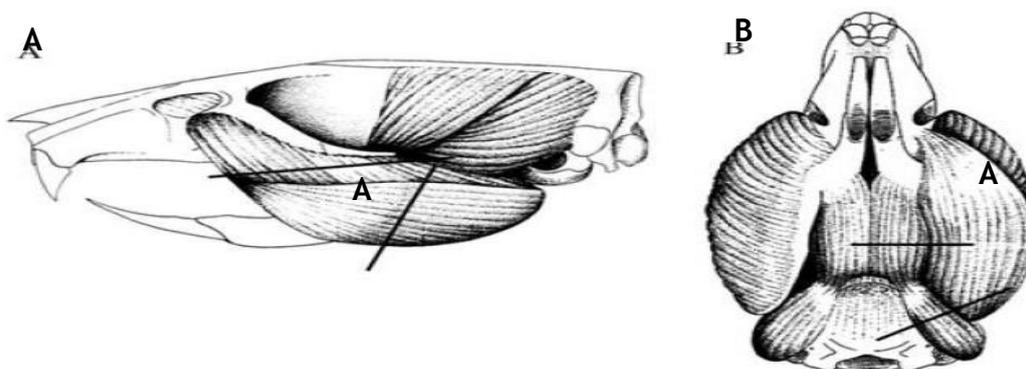
Foram aferidas as seguintes dimensões, segundo a figura 7: *Comprimento da base da mandíbula (CBM)*: distância entre ponto mais inferior anterior da coluna vertebral interdental (I), o ponto mais posterior do processo angular (II); *Altura da mandíbula (AM)*: a distância entre o ponto mais posterior do processo angular (II) e o ponto mais superior do processo coronoide (III); *Área mandibular (ArM)*: calculada a partir de um triângulo formado entre o ponto mais inferior anterior da coluna vertebral interdental (I), o ponto mais posterior do processo angular (II) e o ponto mais superior do processo coronoide (III). $ArM = CBM \times AM$.

5.7 EXTRAÇÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FEIXE SUPERFICIAL MÚSCULO MASSETER

No 35º dia pós-natal, os animais foram eutanasiados por decapitação. Após a eutanasia, foi feita uma incisão longitudinal anterior na região cervical, sendo dissecado o feixe superficial do músculo masseter do lado esquerdo (Figura 8), fixados em N-Hexano e em seguida pesados. A massa de cada músculo (MM, em gramas) foi mensurada com auxílio de uma balança. Após a pesagem, os músculos

foram imediatamente congelados em n-hexano resfriado em gelo seco e posteriormente transferidos para o freezer a -80°C até análise da ATPase miofibrilar.

Figura 8 - Vista lateral (fig. 8 A) e anterior (fig. 8 B), do feixe superficial do músculo masseter (A)



Fonte: Sano et al., 2007.

Para a mATPase, os músculos foram fixados em suporte com utilização do *Tissuetek*® e mantidos a -20°C . Para obtenção das secções transversas de $10\mu\text{m}$ de espessura, foi utilizado o criostato (LEICA modelo CM1100, Nussloch– Alemanha). Os cortes foram fixados em lâminas e quando atingiram temperatura ambiente foi iniciada a coloração. Os cortes transversais fixados foram corados pela técnica da miosina miofibrilar adenosina trifosfatase cálcio ativada (mATPase), que permite a distinção entre fibras rápidas (tipo IIa e IIb) e lentas (tipo I), através de pré-incubação em dois diferentes níveis de pH (4,3 e 4,55), com incubação em pH alcalino (9,4).

Os cortes foram pré-incubados em temperatura ambiente por 10 minutos em solução de 400 ml contendo ácido acético a 0,2M (12,7 ml de ácido acético e 1000 ml de água destilada) e 120 ml de acetato de sódio a 0,2M (27,2g de acetato de sódio e 1000 ml de água destilada) com pH ajustado para 4,3 ou 4,55. Em seguida as lâminas foram lavadas e incubadas a 37°C em uma solução com pH ajustado para 9,4 contendo ATP durante 40 minutos.

Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em solução de cloreto de cobalto a 2% durante 5 minutos e reveladas em solução de sulfeto de amônio 5%. Após a revelação, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de 30% a 100%, por fim as lâminas foram

imersas duas vezes no tolueno. Após a secagem as lâminas foram montadas utilizando New Entellan® (BROOKE E KAISER, 1970).

As fibras musculares foram classificadas de acordo com a intensidade de reação da ATPase, onde a pré-incubação em meio ácido pH 4,3 permitiu diferenciar as fibras lentas tipo I (escuras) e rápidas tipo II (claras), e os dois subtipos das fibras rápidas, tipo Iia (claras) e tipo Iib (coloração intermediária), no pH 4,55 (BROOKE e KAISER, 1970).

Os campos microscópicos foram obtidos através de microscópio óptico OLYMPUS modelo U-CMAD-2 (objetiva 4X) acoplado a um programa para captação de imagens (TV TUNER APPLICATION – TeSignalCompanyLimited, Taiwan). Para contagem das células foi utilizado o software MENSURIN PRO versão 3.2 (Jean-François Madre-Amiens, França). Todas as fibras foram contadas em cada corte histológico.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados. Para a análise do peso corporal foi realizado o teste ANOVA Two-way repeated measures, seguida de *Bonferroni's Post Test* ($p < 0,05$). Os parâmetros mastigatórios, consumo alimentar, peso muscular, composição de fibras musculares e medidas da mandíbula foram analisados através do teste ANOVA one way. Estas análises foram seguidas do *Tukey's post test* ($p < 0,05$). Os dados foram analisados através do software SigmaStart® versão 5.0 e os gráficos feitos no Prisma® 6.0. Os dados obtidos estão apresentados em média e desvio padrão de média.

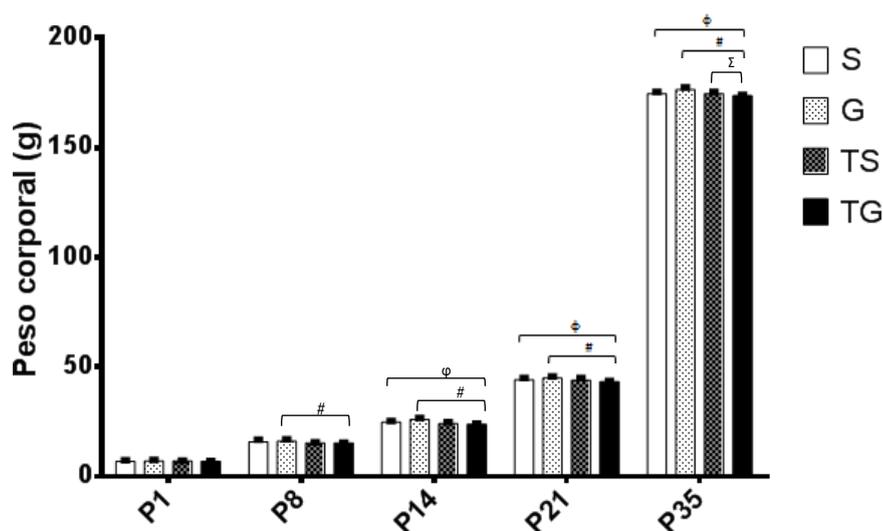
6 RESULTADOS

6.1 PESO CORPORAL

O grupo TG ($15,37 \pm 0,421$) apresentou menor peso corporal quando comparado ao grupo G ($15,42 \pm 0,337$) ($P=0,026$) a partir do oitavo até os 35 dias de idade (Figura 9). Do 14º ao 35º dia, o grupo TG ($23,93 \pm 0,659$) também apresentou menor peso corporal comparado ao grupo S ($24,89 \pm 0,460$) ($P=0,016$) (Figura 9). Por fim, aos 35 dias de vida, o peso corporal do grupo TG ($172,65 \pm 0,751$) foi menor quando comparado também ao grupo TS ($173,9 \pm 0,746$) ($P=0,005$) (Figura 9).

Na figura 9, observa-se os efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre o peso corporal de ratos aos 1, 8, 14, 21 e 35 dias de vida. Os animais foram submetidos à administração de salina ($n=10$), glicose ($n=10$), L-Triptofano + salina ($n=10$) ou L-Triptofano + glicose ($n=10$) durante a lactação. Os dados foram expressos em Média \pm DPM. ANOVA *Two-way* medidas repetidas (Triptofano e Idade). Múltiplas comparações (Teste de Tukey). # Diferença entre os grupos G e TG ($P<0,05$). ϕ Diferença entre os grupos S e TG ($P<0,05$). Σ Diferença entre os grupos TS e TG ($p<0,05$),

Figura 9 - Efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre o peso corporal de ratos aos 1, 8, 14, 21 e 35 dias de vida



Fonte: resultados da pesquisa

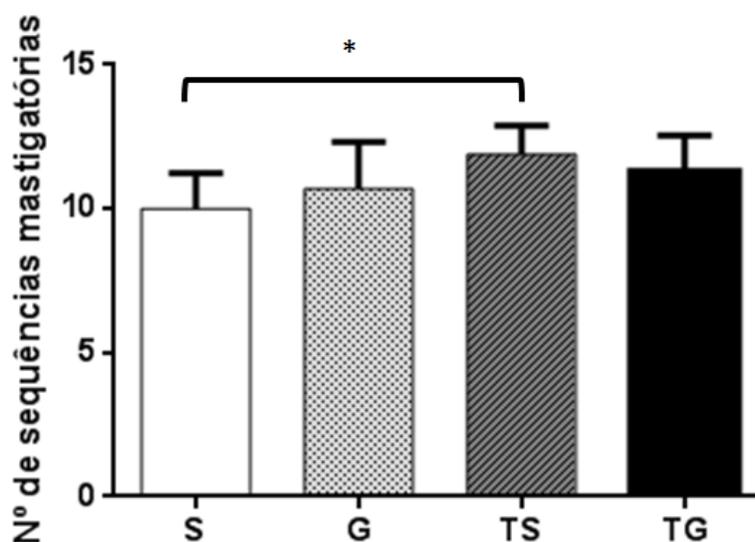
6.2 PARÂMETROS MOTORES DA MASTIGAÇÃO

6.2.1 Número de sequências mastigatórias

Os animais do grupo TS ($12,2 \pm 0,788$) realizaram maior número de sequências da mastigação que os animais do grupo S ($10 \pm 1,24$) ($P=0,015$).

Na figura 10, verifica-se os efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre o número de sequências mastigatórias de ratos aos 21 dias de vida. Os animais foram submetidos à administração de salina ($n=10$), glicose ($n=10$), L-Triptofano + salina ($n=10$) ou L-Triptofano + glicose ($n=10$) durante a lactação. Os dados foram expressos em Média \pm DPM. ANOVA *One-way*. Múltiplas comparações (Teste de Tukey). * Diferença entre os grupos S e TS ($P<0,05$).

Figura 10 - Efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre o número de sequências mastigatórias de ratos aos 21 dias de vida



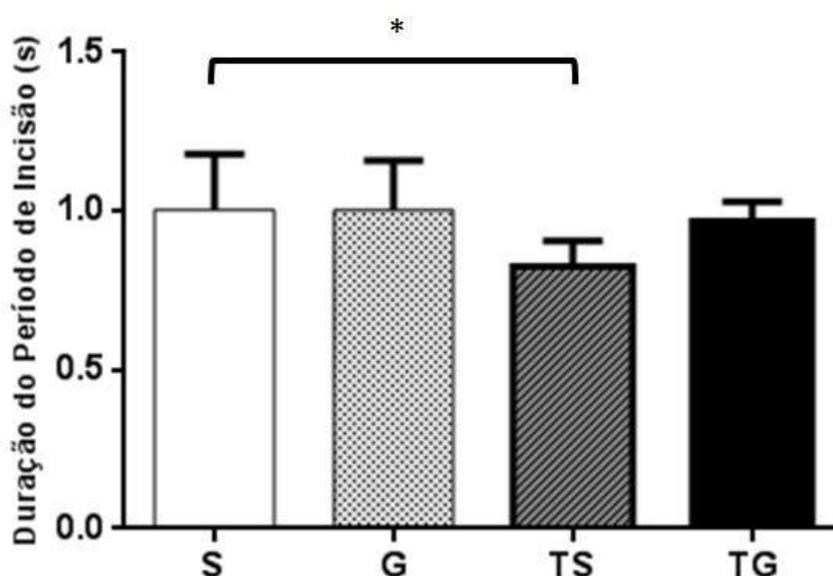
Fonte: resultados da pesquisa.

6.2.2 Duração do período de incisão

O período de incisão teve menor duração no grupo TS ($0,826 \pm 0,147$) em relação ao grupo S ($1,005 \pm 0,977$) ($P= 0,017$). (Figura 11).

Na figura 11, os efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre a duração do período de incisão de ratos aos 21 dias de vida. Os animais foram submetidos à administração de salina (n=10), glicose (n=10), L-Triptofano + salina (n=10) ou L-Triptofano + glicose (n=10) durante a lactação. Os dados foram expressos em Média \pm DPM. ANOVA One-way. Múltiplas comparações (Teste de Tukey). * Diferença entre os grupos S e TS (P<0,05).

Figura 11 - Efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre a duração do período de incisão de ratos aos 21 dias de vida.



Fonte: resultados da pesquisa.

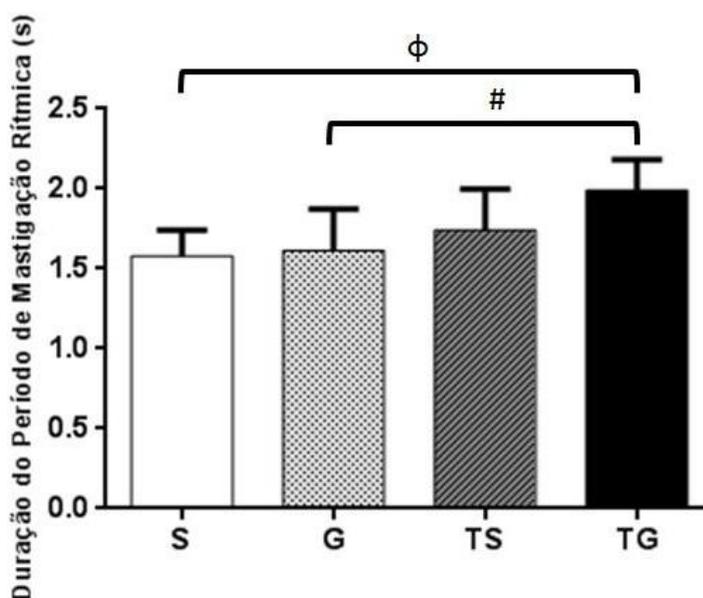
6.2.3 Duração do período de mastigação rítmica

O grupo TG ($1,99 \pm 0,192$) apresentou maior duração do período de mastigação rítmica que os animais dos grupos S ($1,57 \pm 1,537$) ($P=0,001$) e do grupo G ($1,61 \pm 0,261$) ($P= 0,003$), respectivamente (Figura 12).

Observa-se na figura 12, os 12 Efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre a duração do período de mastigação rítmica de ratos aos 21 dias de vida. Os animais foram submetidos à administração de salina (n=10), glicose (n=10), L-Triptofano + salina (n=10) ou L-Triptofano + glicose (n=10) durante a lactação. Os dados foram expressos em Média \pm DPM. ANOVA One-way. Múltiplas comparações

(Teste de Tukey). ϕ Diferença entre os grupos S e TG ($P < 0,05$). # Diferença entre os grupos G e TG ($P > 0,05$).

Figura 12 - Efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre a duração do período de mastigação rítmica de ratos aos 21 dias de vida.



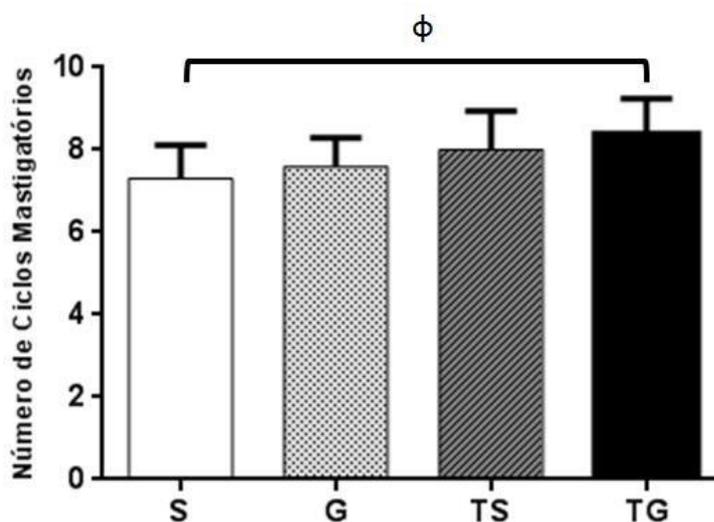
Fonte: resultados da pesquisa.

6.2.4 Número de ciclos mastigatórios

Na figura 13 pode ser observado que o grupo TG ($7,51 \pm 0,701$) realizou mais ciclos mastigatórios que o grupo S ($6,23 \pm 0,505$) ($P < 0,027$).

Na Figura 13, verificou-se efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre a o número de ciclos mastigatórios de ratos aos 21 dias de vida. Os animais foram submetidos à administração de salina ($n=10$), glicose ($n=10$), L-Triptofano + salina ($n=10$) ou L-Triptofano + glicose ($n=10$) durante a lactação. Os dados foram expressos em Média \pm DPM. ANOVA One-way. Múltiplas comparações (Teste de Tukey). ϕ Diferença entre os grupos S e TG ($P < 0,05$).

Figura 13: Efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre a o número de ciclos mastigatórios de ratos aos 21 dias de vida



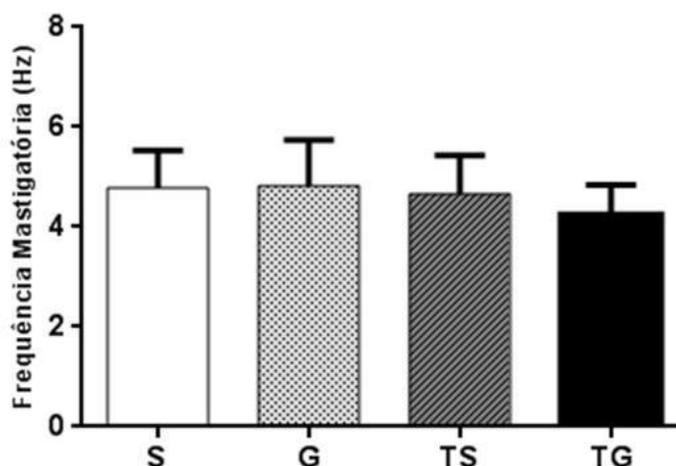
Fonte: resultados da pesquisa.

6.2.5 Frequência mastigatória

Os grupos S ($4,25 \pm 0,693$), G ($4,36 \pm 0,378$), TS ($4,42 \pm 0,605$) e TG ($3,83 \pm 0,391$) não apresentaram diferenças na frequência mastigatória (Figura 14).

Na figura 14, verificou-se os efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre a frequência mastigatória de ratos aos 21 dias de vida. Os animais foram submetidos à administração de salina ($n=10$), glicose ($n=10$), L-Triptofano + salina ($n=10$) ou L-Triptofano + glicose ($n=10$) durante a lactação. Os dados foram expressos em Média \pm DPM. ANOVA One-way. Múltiplas comparações (Teste de Tukey). ϕ Diferença entre os grupos S e TG ($P < 0,05$). # Diferença entre os grupos G e TG ($P > 0,05$).

Figura 14 - Efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre a frequência mastigatória de ratos aos 21 dias de vida.



Fonte: resultados da pesquisa.

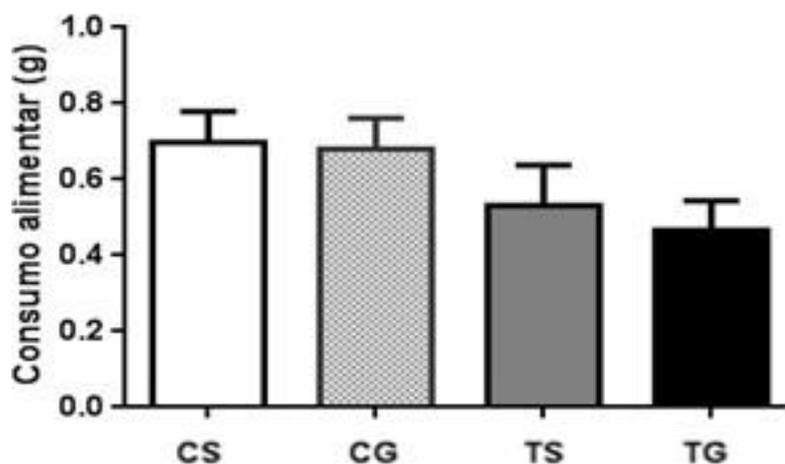
6.2.6 Consumo alimentar durante teste da mastigação

6.2.6.1 Absoluto

O consumo alimentar durante o teste da mastigação foi semelhante entre os grupos S ($0,698 \pm 0,254$), G ($0,680 \pm 0,256$), TS ($0,532 \pm 0,333$) e TG ($0,465 \pm 0,245$) (Figura 15).

Na figura 15, observou-se os efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre o consumo alimentar durante o teste da mastigação de ratos aos 21 dias de vida. Os animais foram submetidos à administração de salina (n=10), glicose (n=10), L-Triptofano + salina (n=10) ou L-Triptofano + glicose (n=10) durante a lactação. Os dados foram expressos em Média \pm DPM. ANOVA One-way. Múltiplas comparações (Teste de Tukey). ϕ Diferença entre os grupos S e TG ($P < 0,05$). # Diferença entre os grupos G e TG ($P > 0,05$).

Figura 15 - Efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre a o consumo alimentar durante o teste da mastigação de ratosaos 21 dias de vida.



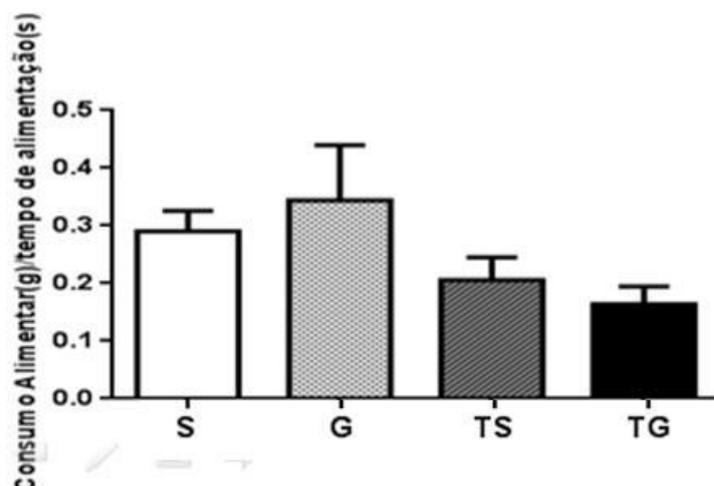
Fonte: resultados da pesquisa.

6.2.6.2 Relativo ao tempo de alimentação

A figura 16 mostra que não houve diferenças entre os grupos no consumo alimentar durante o teste da mastigação relativo ao tempo de alimentação.

Na figura 16, os efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre o consumo alimentar durante o teste de mastigação relativo ao tempo de alimentação de ratosaos 21 dias de vida. Os animais foram submetidos à administração de salina (n=10), glicose (n=10), L-Triptofano + salina (n=10) ou L- Triptofano + glicose (n=10) durante a lactação. Os dados foram expressos em Média \pm DPM. ANOVA One-way. Múltiplas comparações (Teste de Tukey). ϕ Diferença entre os grupos S e TG (P<0,05). # Diferença entre os grupos G e TG (P>0,05).

Figura 16: Efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre o consumo alimentar durante o teste de mastigação relativo ao tempo de alimentação de ratos aos 21 dias de vida



Fonte: resultados da pesquisa.

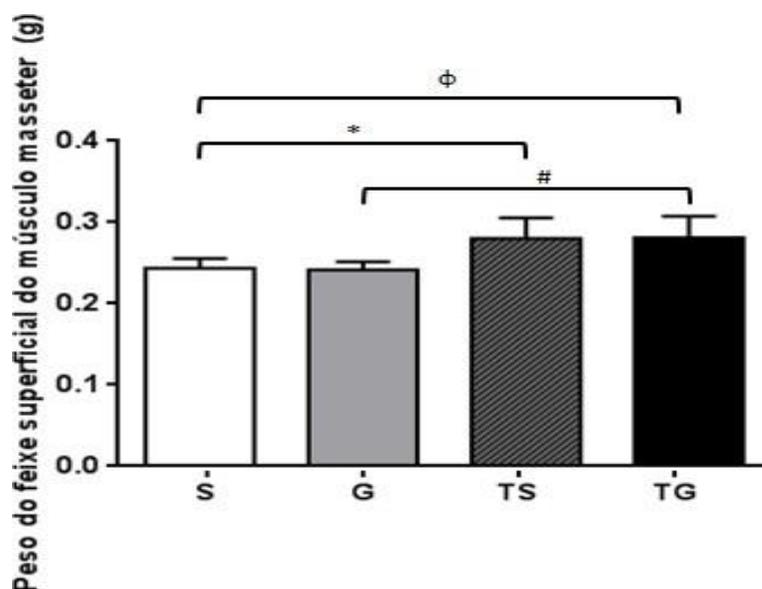
6.3 PROPRIEDADES MUSCULARES

6.3.1 Peso do feixe superficial do músculo masseter

O peso do feixe superficial do músculo masseter foi maior nos grupos TS ($0,280 \pm 0,025$) e TG ($0,281 \pm 0,026$) quando comparado ao grupo S ($0,243 \pm 0,122$) ($P=0,001$) (Figura 17). O grupo TG também apresentou maior peso muscular que o grupo G ($0,241 \pm 0,0098$) ($P<0,001$) (Figura 17).

Figura 17, eEfeitos do L-Triptofano e L-Triptofano associado à glicose sobre o peso do feixe superficial do músculo masseter em ratos com 35 dias de vida. Os animais foram submetidos a administração de salina ($n=10$), glicose ($n=10$), L-Triptofano + salina ($n=10$) ou L-Triptofano + glicose ($n=10$) durante a lactação (ANOVA *One-way*). Os dados foram expressos em Média \pm DPM. Múltiplas comparações (Tukey's post test). * Diferença entre os grupos S e TS. Φ Diferença entre os grupos S e TG. # Diferença entre os grupos G e TG ($P<0,05$).

Figura 17, efeitos do L-Triptofano e L- Triptofano associado à glicose sobre o peso do feixe superficial do músculo masseter em ratos com 35 dias de vida



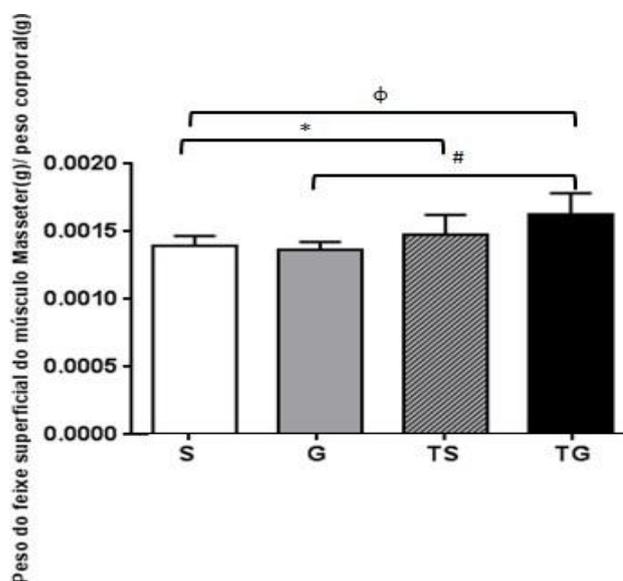
Fonte: resultados da pesquisa.

6.3.2 Peso do feixe superficial do músculo masseter relativo ao peso corporal

Ao relativizar o peso do feixe superficial do músculo masseter ao peso corporal dos animais, também observamos um aumento no grupo TS ($0,001479 \pm 0,00014$) e TG ($0,001628 \pm 0,000154$) ao compararmos com os grupos S ($0,001395 \pm 0,00007$) ($P < 0,001$) e G ($0,0013 \pm 0,00018$) ($P = 0,001$), respectivamente (Figura 18).

Figura 18, efeitos do L-Triptofano e L- Triptofano associado à glicose sobre o peso do feixe superficial do músculo masseter relativo ao peso corporalem ratos com 35 dias de vida. Os animais foram submetidos a administração de salina (n=10), glicose (n=10), L-Triptofano + salina (n=10) ou L- Triptofano + glicose (n=10) durante a lactação (ANOVA *One-way*). Os dados foram expressos em Média \pm DPM. Múltiplas comparações (Tukey's post test). * Diferença entre os grupos S e TS. Φ Diferença entre os grupos S e TG. # Diferença entre os grupos G e TG ($P < 0,05$).

Figura 18: Efeitos do L-Triptofano e L- Triptofano associado à glicose sobre o peso do feixe superficial do músculo masseter relativo ao peso corporal em ratos com 35 dias de vida



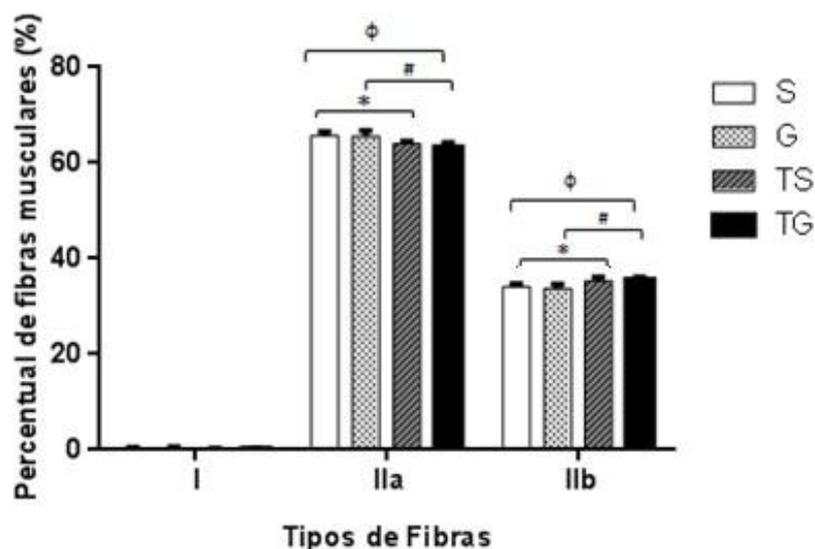
Fonte: resultados da pesquisa.

6.3.3 Distribuição das fibras do feixe superficial do músculo masseter

O grupo TS (Fibra IIA: $64,4 \pm 0,9542$; Fibra tipo IIB: $34,1 \pm 0,668$) apresentou menor proporção de fibras do tipo IIA e aumento da proporção de fibras IIB em relação ao grupo S (Fibra IIA: $65,7 \pm 0,900$; Fibra tipo IIB: $32,2 \pm 0,82$) ($P < 0,001$). O grupo TG (Fibra IIA: $63,3 \pm 0,846$; Fibra tipo IIB: $35,618 \pm 0,557$) também apresentou menor quantidade de fibras do tipo IIA e maior proporção de fibras IIB, quando comparado ao grupo G (Fibra IIA: $65,54 \pm 1,158$; Fibra tipo IIB: $33,7 \pm 0,856$) ($P < 0,001$) e ao grupo S (Fibra IIA: $65,7 \pm 0,900$; Fibra tipo IIB: $32,2 \pm 0,82$) ($P < 0,001$).

Na Figura 1, os efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre a distribuição de fibras do músculo masseter de ratos aos 35 dias de vida. Os animais foram submetidos à administração de salina ($n=10$), glicose ($n=10$), L-Triptofano + salina ($n=10$) ou L-Triptofano + glicose ($n=10$) durante a lactação. Os dados foram expressos em Média \pm DPM. ANOVA One-way. Múltiplas comparações (Teste de Tukey). * Diferença entre os grupos S e TS. Φ Diferença entre os grupos S e TG. # Diferença entre os grupos G e TG ($P < 0,05$).

Figura 19 - Efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre a distribuição de fibras do músculo masseter de ratos aos 35 dias de vida.



Fonte: resultados da pesquisa.

6.4 DIMENSÕES MANDIBULARES

Não foram observadas diferenças nas medidas da base, altura e área da mandíbula entre os grupos S (Base: $25,01 \pm 0,510$; altura: $9,27 \pm 0,22$; área: $243,98 \pm 8,83$), G (Base: $25,46 \pm 0,41$; altura: $9,46 \pm 0,07$; área: $241,11 \pm 4,44$), TS (Base: $25,71 \pm 0,13$; altura: $9,48 \pm 0,10$; área: $243,81 \pm 3,02$) e TG (Base: $25,15 \pm 0,33$; altura: $9,50 \pm 0,07$; área: $238,88 \pm 3,43$).

Na tabela 2, os efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre as dimensões mandibulares de ratos aos 35 dias de vida. Os animais foram submetidos à administração de salina (n=10), glicose (n=10), L-Triptofano + salina (n=10) ou L-Triptofano + glicose (n=10) durante a lactação. Os dados foram expressos em Média \pm DPM. ANOVA One-way. Múltiplas comparações (Teste de Tukey). ϕ Diferença entre os grupos S e TG ($P < 0,05$). # Diferença entre os grupos G e TG ($P > 0,05$).

Tabela 2 - Efeitos do L-Triptofano associado ou não à glicose sobre as dimensões mandibulares de ratos aos 35 dias de vida.

	S	G	TS	TG
Base (cm)	25,01±0,51	25,46±0,41	25,71±0,13	25,15±0,33
Altura (cm)	9,27±0,22	9,46±0,07	9,48±0,10	9,50±0,07
Área (cm ²)	233,98±8,83	241,11±4,44	243,81±3,02	238,88±3,4 3

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, hipotetizamos que a administração neonatal ao L-triptofano, associado ou não à glicose, melhora a eficiência mastigatória em ratos jovens. Para responder esta hipótese, analisamos os efeitos do L-triptofano adicionado ou não de glicose sobre os parâmetros motores da função mastigatória, o peso e fenótipo das fibras musculares do feixe superficial do músculo masseter e as dimensões mandibulares. Trata-se de um estudo pioneiro, pois não há relatos na literatura que descrevam os efeitos da administração de L-Triptofano isolado ou associado à glicose sobre a eficiência da mastigação. Os resultados obtidos permitiram avaliar as consequências da manipulação do sistema serotoninérgico sobre a eficiência mastigatória, que é essencial para uma nutrição adequada e manutenção da saúde em geral.

Estudos têm mostrado que tratamento com triptofano é capaz de provocar alterações no sistema serotoninérgico (FERNSTROM; WURTMAN, 1971b; HENRY et al., 1992; ESTEBAN et al., 2004; MATEOS et al., 2009). Fernstrom e Wurtman (1971b) administraram diferentes doses de L-triptofano em ratos adultos e observaram aumento da serotonina proporcional às doses de L-triptofano administrada. Henry e colaboradores (1992) observaram aumento hipotalâmico da 5-HT mediante suplementação dietética de 4% de triptofano em porcos. Esteban e cols. (2004) administraram por via oral 300mg/kg de triptofano por 5 dias e observaram aumento dos níveis cerebrais de serotonina e maior atividade da triptofano hidroxilase. Em outro estudo, foram administrados durante 7 dias 125mg/Kg de triptofano por via oral e também foi detectado aumento da serotonina (MATEOS et al., 2009).

Ademais, a associação entre administração de triptofano e glicose facilita a conversão do triptofano em serotonina (FERNSTROM; WURTMAN, 1971a). Segundo Fernstrom (2015), picos de insulina podem diminuir as concentrações séricas dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), que competem com o triptofano pelo transportador na barreira hematoencefálica. Ao suplementar glicose para atletas de *endurance*, Davis e colaboradores (1992) observaram diminuição do BCAA sérico durante o pico de insulina, mas ao fim do exercício estes níveis se normalizaram.

Fernstrom e Wurtman (1971b) observaram aumento de 40% do triptofano plasmático e cerebral de ratos adultos após 2h de administração de insulina ou de exposição à dieta rica em carboidratos. Com base nestes estudos, acreditamos que a administração de L-triptofano e L-triptofano associado à glicose aumenta a concentração de triptofano cerebral, favorecendo a síntese de 5-HT.

No presente estudo, animais tratados com L-Triptofano isolado e associado à glicose apresentaram menor peso corporal. Nossos achados corroboram com Ayaso e colaboradores (2014), que também observaram redução do peso corporal em animais suplementados com triptofano. Por sua vez, Carvalho–Santos e colaboradores (2010), não observaram diferenças no peso corporal de animais nutridos tratados com 50mg/Kg de L-triptofano por 14 dias. Esta discrepância pode ser devida ao menor tempo de tratamento e menor dose administrada por estes autores. O *“lean phenotype”* é observado em ratos jovens e adultos em vários estudos após manipulação neonatal do sistema serotoninérgico (GALINDO et al., 2015; PINHEIRO et al., 2017a). O papel desempenhado pela 5-HT na modulação da ingestão alimentar e da saciedade é bem conhecido (CARLINI et al., 2007). Assim, a manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico reduz o consumo alimentar e contribui para perda de peso (HALFORD et al., 2007). Ingestão alimentar reduzida e perda de peso significativa foram observadas em ratos após manipulação serotoninérgica com ISRS (BARRETO-MEDEIROS, et al, 2002; CARLINI et al., 2007). Associado a isso, a manipulação serotoninérgica neonatal parece induzir adaptações metabólicas que favorecem o gasto energético. A manipulação neonatal do sistema serotoninérgico promoveu manutenção tardia do fenótipo magro, mesmo mediante exposição à dieta hipercalórica (GALINDO et al., 2015). Kummet e colaboradores (2012) associaram a ISRS a um estado hipermetabólico, com baixo peso corporal associado à alta ingestão calórica e aumento do $VO_{2máx}$. O peso corporal também pode ser influenciado pela mastigação (ZHU; HOLLIS, 2015; SAKATA et al., 2013; MELANSON et al., 2017; MASAKI et al., 2001). Na literatura, autores descrevem que o aumento do número de ciclos mastigatórios antes de engolir tem efeito sobre o peso corporal (ZHU; HOLLIS, 2015; SAKATA et al., 2013). Segundo Douglas (2002), a movimentação dos músculos orofaciais envolvidos nesse processo gera uma resposta mais rápida ao estímulo da saciedade. Corroborando com essa ideia, um estudo com humanos observou menor tamanho

das refeições em pessoas que mastigaram chiclete antes das refeições (MELANSON et al., 2017). Zhu e Hollis (2015) observaram relação inversamente proporcional entre o número de ciclos mastigatórios e o IMC. Sakata et al. (2003) em um estudo com ratos, verificaram que a mastigação altera a ativação do núcleo sensorial do nervo trigêmeo, modificando a sensação de saciedade através da liberação de histamina. A histamina age no hipotálamo e além de reduzir a ingestão alimentar, diminui a adiposidade abdominal e melhora a resposta a leptina (MASAKI et al., 2001). Com base nestes estudos, acreditamos que a redução do peso corporal dos animais tratados com L-triptofano associado ou não a glicose pode ser causada pelo aumento da 5-HT bem como ser reflexo do padrão de mastigação realizado por estes animais.

Observamos que os animais tratados com L-Triptofano associado à glicose tiveram maior número de ciclos mastigatórios e maior duração do período de mastigação rítmica, sem diferenças sobre o consumo alimentar durante o teste da mastigação. Segundo Van der Bilt e Abbink (2017), alimentos duros (como a ração oferecida aos animais neste estudo) necessitam de maior número de sequências e ciclos mastigatórios para que sua trituração seja adequada e eficiente. O tempo de mastigação, aqui representado pelo período de mastigação rítmica, também deve ser maior quando o alimento tem textura mais sólida (KORFAGE et al., 2005). Desse modo, levando em consideração a consistência da refeição dos animais, estes achados podem ser indicativos de aumento da eficiência mastigatória por ação do triptofano. Um possível fator associado à melhora da eficiência mastigatória mediante administração de triptofano seria o aumento da produção de serotonina pelo precursor triptofano, visto que esta monoamina otimiza a despolarização e potencial de disparo nos neurônios trigeminais além de regular os movimentos rítmicos de abertura e fechamento da mandíbula (DELLOW; LUND, 1971; RIBEIRO-DO-VALLE, 1997).

Não foram encontrados na literatura estudos envolvendo o tratamento com L-triptofano e/ou glicose e a eficiência mastigatória. Contudo, as consequências da manipulação do sistema serotoninérgico através da desnutrição perinatal sobre a eficiência mastigatória foram analisadas (FERRAZ-PEREIRA et al., 2015; LACERDA et al., 2017). De acordo com Pinheiro (2017a), a desnutrição no período crítico de

desenvolvimento provoca mudanças estruturais e funcionais no SNC, sobretudo no sistema serotoninérgico. A exposição perinatal a dieta hipoproteica aumenta a disponibilidade cerebral de triptofano na vida adulta, resultando em aumento da produção de 5HT (MANJARREZ, 1994; MARTIMINIANO et al., 2017). Este fenótipo em longo prazo é uma adaptação ao insulto nutricional no período crítico (MANJARREZ, 1994), visto que a desnutrição protéica perinatal reduz os níveis de Triptofano na placenta e no cérebro dos embriões (MARTIMINIANO et al., 2017). Ferraz-Pereira e colaboradores (2017) observaram redução dos ciclos mastigatórios em animais submetidos à desnutrição neonatal (modelo experimental que causa aumento da serotonina cerebral). Lacerda e colaboradores (2017), também encontraram redução do número de ciclos mastigatórios em ratos desnutridos. Essa baixa disponibilidade de triptofano no período crítico, observada em ratos desnutridos, pode ter relação com a redução da eficiência mastigatória citada nos estudos utilizando esse modelo.

Os animais tratados com L-Triptofano, associado ou não a glicose, apresentaram aumento do peso do feixe superficial do músculo masseter. Acreditamos que esta adaptação muscular pode ser justificada por uma maior demanda de força muscular, dado o fato dos animais tratados com L-Triptofano realizarem maior número de ciclos mastigatórios. Esta afirmativa é sustentada pelo trabalho de Guimarães e colaboradores (2013), que associaram positivamente o tamanho do masseter e densidade das fibras musculares com a força de mordida, outro parâmetro bastante estudado para avaliar a eficiência mastigatória. Além do mais, no tocante a distribuição dos tipos de fibras musculares no feixe superficial do músculo masseter, os grupos tratados com L-Triptofano associado ou não à glicose apresentaram diminuição da proporção de fibras tipo IIa e aumento da distribuição de fibras tipo IIb quando comparados a seus respectivos controles. Estes achados em associação com os resultados do teste dos parâmetros motores da mastigação são sugestivos de adaptação fenotípica muscular nos animais dos grupos TS e TG. Segundo Yamane (2005), o fenótipo das fibras musculares só é estabelecido após a mudança do padrão motor de ingestão alimentar de sucção para mastigação, quando as demandas de força muscular se alteram. Além disso, tendo em vista a função muscular, estudos têm reportado que o tipo de fibras muscular predominante em um músculo depende da função e quantidade de força exigida por este (SANO et

al., 2007). No caso do músculo masseter, este é um dos principais músculos de controle dos movimentos mandibulares (CASTROGIOVANI et al., 2013). Para a realização dos ciclos mastigatórios são necessários movimentos rápidos e vigorosos de elevação da mandíbula (DOUGLAS, 2002). Assim, o maior número de ciclos mastigatórios e período de mastigação rítmica observados no presente estudo exercem maior demanda sobre o masseter. Logo, o aumento da proporção de fibras IIb é justificado pela maior demanda de força no músculo masseter, uma vez que esta isoforma de miosina tem característica de contração rápida e vigorosa (DOUGLAS, 2002).

Em relação às dimensões mandibulares, não observamos diferenças nas medidas da base, altura e área mandibular. Tais resultados podem ser consequência da realização de manipulação serotoninérgica somente na lactação. Sabe-se que é no período gestacional ocorrem os principais eventos de diferenciação do tecido ósseo e desenvolvimento craniofacial mediados pela 5HT (ALIPPI et al., 2002; MOISEIWITSCH, 2000; LAUDER, 1997). Nascimento e colaboradores (2010), ao administrar cloridrato de fluoxetina em ratos na lactação, também não observaram diferenças na ontogênese da articulação temporo mandibular (ATM) dos animais. Na literatura também não foram encontrados estudos avaliando as medidas das dimensões da mandíbula mediante a administração neonatal com L-triptofano, destacando mais uma vez o caráter inovador deste estudo. Contudo, estudos analisando o papel da serotonina na morfogênese do tecido ósseo foram realizados; alguns mostrando um estimulação da formação óssea pela 5HT (WESTBROEK et al., 2001; BLIZIOTES et al., 2006; GUSTAFSSON et al., 2006), outros, um efeito inibitório e redução da massa óssea (YADAV et al., 2008). Apesar destas divergências, sabe-se que outros metabólitos do triptofano (como a triptofano hidroxilase e os metabólitos das quinureninas) também parecem desempenhar papel importante na regulação do metabolismo ósseo (MICHALOWSKA et al., 2015). Favorecendo o correto desenvolvimento deste tecido (LAVOIE et al., 2017; MICHALOWSKA et al., 2015).

Em resumo, animais tratados com L-Triptofano em associação à glicose apresentaram maior eficiência mastigatória que os grupos controle. Nestes animais foi observado um tempo maior de alimentação e maior quantidade de ciclos mastigatórios, indicativos de uma trituração mais adequada (VAN DER BILT;

ABBINK, 2017). Os animais tratados somente com L-triptofano, também tiveram sua eficiência mastigatória melhorada, porém de forma mais sutil. Corroborando com esses achados, observou-se maior peso do feixe superficial do músculo masseter e maior proporção de fibras tipo IIb (de contração rápida e vigorosa) nos animais tratados com L-triptofano associado ou não a glicose. Estes achados mostram a adaptação muscular que permite a estes animais mastigar de forma mais eficiente. Além disso, o menor peso corporal encontrado nos animais mediante tratamento com L-triptofano associado ou não a glicose, também pode ser resultado de uma mastigação mais eficiente e prolongada (ZHU, 2015). Com base nesses achados, confirmamos a hipótese de que o tratamento neonatal com L-triptofano associado ou não a glicose melhora a eficiência mastigatória em ratos jovens.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise dos resultados desta dissertação permite as seguintes conclusões:

- O tratamento neonatal com L-triptofano, isolado e associado à glicose, melhorou a eficiência mastigatória dos animais aos 21 de vida;
- A associação entre glicose e L-triptofano causou perda ponderal maior e mais precoce que a administração isolada de L-Triptofano;
- O L-triptofano diluído em solução salina ou glicosada foi capaz de acelerar o processo de maturação no feixe superficial do músculo masseter;

Como perspectivas, propõe-se:

- Dar continuidade a linha de pesquisa, utilizando o tratamento com L- Triptofano e glicose;
- Analisar os efeitos destes tratamentos no comportamento e consumo alimentar;
- Quantificar as concentrações de 5HT cerebral mediante administração neonatal do L-Triptofano isoladamente ou associado à glicose;
- Avaliar a atividade eletromiográfica dos músculos mastigatórios;
- Quantificar a densidade óssea da mandíbula;

REFERÊNCIAS

AGUILERA, Oscar et al. Epigenetics and environment: a complex relationship. **Journal of applied physiology**, v. 109, n. 1, p. 243-251, 2010.

ALIPPI, Rosa M. et al. Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. **Archives of oral biology**, v. 47, n. 1, p. 47-53, 2002.

AIRES, Margarida M. **Fisiologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

AZMITIA, Efrain C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain research bulletin**, v. 56, n. 5, p. 413- 424, 2001.

AZMITIA, Efrain C. Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis. **International review of neurobiology**, v. 77, p. 31-56, 2007.

BARKER, David JP et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **International journal of epidemiology**, v. 31, n. 6, p. 1235-1239, 2002.

BARNES, Michael D. et al. Intersystem Implications of the Developmental Origins of Health and Disease: Advancing Health Promotion in the 21st Century. In: **Healthcare**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2016. P. 45.

BARRETO MEDEIROS, J. M. et al. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. **Nutritional neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 211-214, 2002.

BLIZIOTES, M. et al. Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. **Bone**, v. 39, n. 6, p. 1313-1321, 2006.

BLIZIOTES, M. M. et al. Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. **Bone**, v. 29, n. 5, p. 477-486, 2001.

BROOKE, Michael H.; KAISER, Kenneth K. Muscle fiber types: how many and what kind?. **Archives of neurology**, v. 23, n. 4, p. 369-379, 1970.

CARVALHO-SANTOS, Judelita et al. Efeito do tratamento com triptofano sobre parâmetros do comportamento alimentar em ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal. **Revista de Nutrição**, 2010.

CASTROGIOVANNI, Paola et al. Effects of high-tryptophan diet on pre-and postnatal development in rats: a morphological study. **European journal of nutrition**, v. 53, n. 1, p. 297-308, 2014.

CHEN, Yiquan; GUILLEMIN, Gilles J. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy states. **International journal of tryptophan research: IJTR**, v. 2, p. 1, 2009.

DA SILVA, Aline Isabel et al. Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 92, n. 4, p. 330-337, 2014.

DEIRÓ, Teresa Cristina Bomfim de Jesus et al. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 66, n. 3B, p. 736-740, 2008.

DELLOW, P. G.; LUND, J. P. Evidence for central timing of rhythmical mastication. **The Journal of physiology**, v. 215, n. 1, p. 1-13, 1971.

DOUGLAS, C. R.; ONCINS, M. C. Fisiologia Geral do Sistema Estomat. **O sistema estomatognático: Anatomia e Desenvolvimento. São José Dos Campos: SP Pulso**, p. 35-57, 2011.

DOUGLAS, Carlos Roberto. **Tratado de fisiologia aplicada à nutrição**. Robe Editorial, 2002.

ESTEBAN, Susana et al. Effect of orally administered L-tryptophan on serotonin, melatonin, and the innate immune response in the rat. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 267, n. 1, p. 39-46, 2004.

FEIJÓ, Fernanda; BERTOLUCI, Marcello Casaccia; REIS, Cíntia. Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 74-77, 2011.

FERNSTROM, J. D. Effects of the diet and other metabolic phenomena on brain tryptophan uptake and serotonin synthesis. In: **Kynurenine and serotonin pathways**. Springer New York, 1991. P. 369-376.

FERNSTROM, John D. et al. Diurnal variations in plasma concentrations of tryptophan, 52ransact, and other neutral amino acids: effect of dietary protein intake. **The American journal of clinical nutrition**, v. 32, n. 9, p. 1912-1922, 1979.

FERNSTROM, John D. et al. The ingestion of different dietary proteins by humans induces large changes in the plasma tryptophan ratio, a predictor of brain tryptophan uptake and serotonin synthesis. **Clinical nutrition**, v. 32, n. 6, p. 1073-1076, 2013.

FERRAZ-PEREIRA, Kelli N. et al. Neonatal low-protein diet reduces the masticatory efficiency in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 9, p. 1515-1530, 2015.

GASPAR, Patricia; CASES, Olivier; MAROTEAUX, Luc. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 12, p. 1002-1012, 2003.

GLUCKMAN, Peter D.; HANSON, Mark A.; LOW, Felicia M. The role of developmental plasticity and epigenetics in human health. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 1, p. 12-18, 2011.

GUSTAFSSON, B. I. et al. Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. **Journal of cellular biochemistry**, v. 98, n. 1, p. 139-151, 2006.

HANSON, M. The birth and future health of DOHaD. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 6, n. 5, p. 434-437, 2015.

HANSON, MA and; GLUCKMAN, P. D. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology?. **Physiological reviews**, v. 94, n. 4, p. 1027-1076, 2014.

HANSON, Mark A.; GLUCKMAN, Peter D. Developmental origins of health and disease: new insights. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 102, n. 2, p. 90-93, 2008.

HSIAO, C. F. et al. Multiple effects of serotonin on membrane properties of trigeminal motoneurons in vitro. **Journal of Neurophysiology**, v. 77, n. 6, p. 2910-2924, 2005.

JACOBS, Barry L.; AZMITIA, Efrain C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiological reviews**, v. 72, n. 1, p. 165-229, 1992.

KUMMET, Gary J. et al. Neonatal SSRI exposure programs a hypermetabolic state in adult mice. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 12, 2012.

LACERDA, Diego Cabral et al. Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats. **Physiology & Behavior**, v. 173, p. 69-78, 2017.

LAKARS, Thomas C.; HERRING, Susan W. Ontogeny of oral function in hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Journal of morphology**, v. 165, n. 3, p. 237-254, 1980.

LAKARS, Thomas C.; HERRING, Susan W. Ontogeny of oral function in hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Journal of morphology**, v. 165, n. 3, p. 237-254, 1980

LAM, Daniel D. et al. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 1, p. 84-91, 2010.

LAUDER, Jean M. Neurotransmitters as morphogens. **Progress in brain research**, v. 73, p. 365-387, 1988.

LAUDER, Jean M. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 600, n. 1, p. 297-313, 1990.

LAUDER, Jean M.; KREBS, Helmut. Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. **Developmental neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 15-30, 1978.

LE FLOC'H, Nathalie; OTTEN, Winfried; MERLOT, Elodie. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. **Amino acids**, v. 41, n. 5, p. 1195- 1205, 2011.

LENARD, Natalie R.; DUNN, Adrian J. Mechanisms and significance of the increased brain uptake of tryptophan. **Neurochemical research**, v. 30, n. 12, p. 1543-1548, 2005.

LESNIAK, Wojciech G. et al. Concurrent quantification of tryptophan and its major metabolites. **Analytical biochemistry**, v. 443, n. 2, p. 222-231, 2013.

LOPES DE SOUZA, Sandra et al. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. **Physiology & behavior**, v. 82, n. 2, p. 375-379, 2004.

LOPES DE SOUZA, Sandra et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1400-1408, 2008.

LUND, James P. Mastication and its control by the brain stem. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-64, 1991.

LUND, James P.; KOLTA, Arlette. Brainstem circuits that control mastication: Do they have anything to say during speech?. **Journal of communication disorders**, v. 39, n. 5, p. 381-390, 2006.

MAGALHÃES, Carolina Peixoto et al. Modulatory role of serotonin on feeding behavior. **Nutritional neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 246-255, 2010.

MAGALHÃES, Carolina Peixoto et al. Neonatal treatment effect with selective 5-HT reuptake inhibitor over the cranium-encephalic anatomic development. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 64, n. 4, p. 990-993, 2006.

MATEOS, Soledad Sánchez et al. Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 104, n. 1, p. 52-59, 2009.

MCNEILL, C. Occlusion: what it is and what it is not. **Journal of the California Dental Association**, v. 28, n. 10, p. 748-758, 2000.

MOISEWITSCH, Julian RD. The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 2, p. 230-239, 2000.

MORGANE, P. J. et al. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 2, n. 3, p. 137-230, 1978.

MORGANE, Peter J.; MOKLER, David J.; GALLER, Janina R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 471-483, 2002.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289-295, 2006.

MOSTAFEEZUR, Rahman Md et al. The effect of minocycline on the masticatory movements following the inferior alveolar nerve transection in freely moving rats. **Molecular pain**, v. 8, n. 1, p. 27, 2012.

PINHEIRO, Isabeli Lins et al. Neonatal fluoxetine exposure modulates serotonergic neurotransmission and disturb inhibitory action of serotonin on food intake. **Behavioural Brain Research**, 2017a.

REISOLI, Elisa et al. Serotonin 2B receptor signaling is required for craniofacial morphogenesis and jaw joint formation in *Xenopus*. **Development**, v. 137, n. 17, p. 2927-2937, 2010.

REN, Yi et al. Immunocytochemical localization of serotonin and serotonin transporter (SET) in taste buds of rat. **Molecular brain research**, v. 74, n. 1, p. 221- 224, 1999.

RIBEIRO-DO-VALLE, L. E. Serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei discharge in association with activity of masticatory muscles. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 30, p. 79-83, 1997.

ROSSI, Luciana; TIRAPÉGUI, Julio. Serotonergic system and its implications on physical exercise. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 2, p. 227-233, 2004.

SAKATA, Toshiie et al. Anti-obesity actions of mastication driven by histamine neurons in rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 10, p. 1106-1110, 2003.

SCHMIDT, L. A.; BURACK, J. A.; VAN LIESHOUT, R. J. Themed Issue on Developmental Origins of Adult Mental Health and Illness. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 7, n. 6, p. 564-564, 2016.

SHABBIR, Faisal et al. Effect of diet on serotonergic neurotransmission in depression. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 3, p. 324-329, 2013.

SHUEY, Dana L.; SADLER, Thomas W.; LAUDER, Jean M. Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. **Teratology**, v. 46, n. 4, p. 367-378, 1992.

SILVA, Luana CA et al. Tryptophan overloading activates brain regions involved with cognition, mood and anxiety. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 273-283, 2017.

SKINNER, Michael K.; MANIKKAM, Mohan; GUERRERO-BOSAGNA, Carlos. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 214-222, 2010.

SULLIVAN, Erin C.; MENDOZA, Sally P.; CAPITANIO, John P. Similarity in temperament between mother and offspring rhesus monkeys: Sex differences and the role of monoamine oxidase-a and serotonin transporter promoter polymorphism genotypes. **Developmental psychobiology**, v. 53, n. 6, p. 549-563, 2011.

WADHWA, Pathik D. et al. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. In: **Seminars in reproductive medicine**. © Thieme Medical Publishers, 2009. P. 358-368.

WELLS, Jonathan CK. Maternal capital and the metabolic ghetto: an evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 1, p. 1-17, 2010.

WESTBROEK, I. et al. Long-term fluoxetine administration does not result in major changes in bone architecture and strength in growing rats. **Journal of cellular biochemistry**, v. 101, n. 2, p. 360-368, 2007.

WEST-EBERHARD, Mary Jane. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 249-278, 1989.

WESTNEAT, Mark W.; HALL, Warren G. Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: an electromyographic analysis of suckling and chewing. **Behavioral neuroscience**, v. 106, n. 3, p. 539, 1992.

WHITAKER-AZMITIA, Patricia M. .1-Serotonin and Development. **Handbook of Behavioral Neuroscience**, v. 21, p. 309-323, 2010.

YADAV, Sangeeta. A Study on Prevalence of Dental Attrition and its Relation to Factors of Age, Gender and to the Signs of TMJ Dysfunction. **The Journal of Indian Prosthodontic Society**, v. 11, n. 2, p. 98-105, 2011.

YADAV, Vijay K. et al. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. **Cell**, v. 135, n. 5, p. 825-837, 2008.

ZAMBRANO, E. et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex-and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. **The Journal of physiology**, v. 571, n. 1, p. 221-230, 2006.

ZHU, Yong; HSU, Walter H.; HOLLIS, James H. Increasing the number of masticatory cycles is associated with reduced appetite and altered postprandial plasma concentrations of gut hormones, insulin and glucose. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 2, p. 384-390, 2013.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO CEUA

Anexo 1: Parecer nº 0038/2016 Comitê de ética em experimentação animal –
UFPE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -CCB
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA



PARECER

Este parecer trata do Processo CEUA 0038-2016 submetido online pelo Professor Raul Manhães de Castro à Comissão de Ética no Uso de Animais para avaliação do uso de *Rattus norvegicus* no projeto de pesquisa intitulado "IMPLICAÇÕES DO TRATAMENTO NEONATAL COM L-TRIPTOFANO NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR, ATIVIDADE LOCOMOTORA E MASTIGAÇÃO EM RATOS COM PARALISIA CEREBRAL". Além do projeto foi anexado o **FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM ENSINO E/OU PESQUISA**. O projeto de pesquisa tem relevante importância, dada a clara necessidade de descoberta de novas terapias para diminuir o fator incapacitante da paralisia cerebral a fim de melhorar a qualidade de vida de seus portadores.

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, os objetivos, os aspectos legais e o bem-estar animal, consideramos a solicitação de pesquisa científica **APROVADA**.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	23/10/2016 - 01/12/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> – Linhagem Wistar
Nº de animais	30
Peso/Idade	90-120d / 220-250g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério de criação do Departamento de Nutrição da UFPE

Recife, 19 de setembro de 2016.