

**Luciana Maria Silva de Seixas Maia**

*Administração de L-Arginina em ratos lactentes normais e desnutridos: efeitos sobre os neurônios que contêm NADPH-diaforase, no córtex visual.*

**Recife, 2004**

**Luciana Maria Silva de Seixas Maia**

*Administração de L-Arginina em ratos lactentes normais e desnutridos: efeitos sobre os neurônios que contêm NADPH-diaforase, no córtex visual.*

Dissertação de mestrado apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição

Auditório Nelson Chaves Data: 15/06/2004

**Mestranda: Luciana Maria Silva de Seixas Maia**

**Orientador: Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes**

**Co-Orientador: Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz**

**Recife, 2004**

*Administração de L-Arginina em ratos lactentes normais e desnutridos:  
efeitos sobre os neurônios que contêm NADPH-diaforase, no córtex visual.*

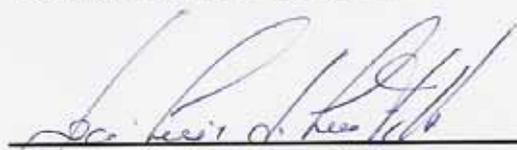
**Luciana Maria Silva de Seixas Maia**

**Data da Aprovação da Dissertação: 15/06/2004**

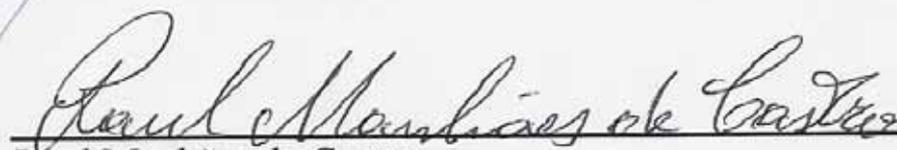
**Banca examinadora:**



Isaías Pereira Padovan



José Luiz de Lima Filho



Raul Manhães de Castro

Ano da Defesa: 2004

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (**LAFINNT**) da Universidade Federal de Pernambuco, sob orientação do professor **Dr Rubem Carlos Araújo Guedes**; tendo uma parte experimental sido feita no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Universidade Federal do Pará, sob orientação do professor **Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz**. Contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**). Nossos sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que ajudaram a realização desta dissertação.

“Quando os problemas se tornam absurdos, os desafios se tornam apaixonantes.”

Helder Câmara

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

Dedico este trabalho à **minha família** que sempre me apoiou e incentivou a estudar e crescer profissionalmente, ampliando cada vez mais meus horizontes.

## **Agradecimentos**

Esta dissertação está sendo concluída após um esforço diário de 2 anos de trabalho. Esforço este apoiado no auxílio de várias pessoas. É difícil citar os nomes de todos os envolvidos direta ou indiretamente no processo de elaboração do mesmo. Existiram, entretanto, colaboradores imprescindíveis. A idéia inicial em estudar os efeitos da Arginina no Sistema Nervoso foi dada pelo professor José Luiz Martins do Nascimento e agradeço a ele a hipótese que foi ventilada motivando o início do trabalho. Na execução do mesmo muitas pessoas que compõem o Departamento de Nutrição e a Pós-Graduação de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, assim como o LAFINNT e o Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Universidade Federal do Pará, colaboraram. Agradeço a todos os professores, secretárias, funcionários, em especial aos funcionários do Biotério. Mas as peças chaves na construção deste trabalho foram meu orientador e co-orientador. Estes grandes professores e cientistas foram à base de tudo. O professor Rubem Carlos de Araújo Guedes além de todo apoio técnico me incentivou e acreditou no meu trabalho, tendo toda a paciência e prontidão em atender-me nos momentos necessários. Também o professor Cristovam Wanderley Picanço Diniz que aceitou colaborar neste processo apoiando e dando condições para que os dados fossem analisados. O exemplo de competência, responsabilidade e simplicidade destes mestres foram fundamentais nesta valiosa etapa de minha formação profissional. Obrigada por acreditarem em mim.

Porém existem pessoas que foram o porto seguro para esta minha empreitada rumo a vida acadêmica. Meus pais, Edigardo e Ofélia, além do meu irmão Fábio sempre me apoiaram e incentivaram a continuar apesar de todas as dificuldades que surgiram pelo caminho. Amigos também foram importantes nesta jornada, dentre os quais

Luciana Andrade Tavares e os professores do Departamento de Histologia da Universidade Federal de Pernambuco, em especial Paulo e Isaías Padovan, que me incentivaram a fazer mestrado e seguir carreira acadêmica. Durante o mestrado tive o prazer de construir novas amizades, estagiários, mestrandos, doutorandos e professores que deram seu apoio e contribuição. Em especial Marília Ferreira Frazão, Ângela Amâncio e Ana Paula Rocha de Melo que foram presenças constantes e importantes nesta caminhada.

Muito obrigada!!!

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	16
1.Nutrição e Sistema Nervoso.....	16
2.L-Arginina, Óxido Nítrico e Sistema Nervoso.....	20
3.NADPH-diaforase e sintase do óxido nítrico.....	23
JUSTIFICATIVA.....	27
HIPÓTESES.....	28
OBJETIVOS.....	29
1.Objetivo Geral.....	29
2.Objetivos Específicos.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
1.Obtenção dos animais.....	31
2.Alimentação dos animais.....	35
3.Controle do peso corporal e peso encefálico.....	39
4.Procedimento cirúrgico para perfusão.....	39
5.Processamento histológico do cérebro.....	41
6.Análise microscópica.....	42
7.Análises estatísticas.....	46
RESULTADOS.....	47

1.Peso Corporal.....	47
2.Peso encefálico.....	47
3.Análises quantitativas.....	48
3.1.Análises bidimensionais.....	48
3.2.Análises tridimensionais.....	48
3.2.1.Morfometria do corpo celular.....	48
3.2.2.Morfometria dos dendritos.....	49
DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÕES.....	71
PERSPECTIVAS.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXO 1.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. ANOVA – Análise de Variância
2. ARG – L-Arginina
3. DA – Depressão Alastrante Cortical
4. DBR – Dieta Básica Regional
5. DF – Dimensão Fractal
6. DV – Densidade de Varicosidade
7. eSON – Sintase do Óxido Nítrico endotelial
8. HIST – L-Histidina
9. ING - ingênuo
10. iSON – Sintase do Óxido Nítrico induzida
11. LAFINNT – Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
12. N<sub>12</sub> – Ninhada de 12 filhotes por mãe
13. N<sub>6</sub> – Ninhada de 6 filhotes por mãe
14. NADPH – Nicotinamida adenina Di-nucleotídeo fosfato
15. NADPH-d – Nicotinamida Adenina Di-nucleotídeo fosfato diaforase
16. NMDA – N – metil – D – aspartato
17. nSON – Sintase do Óxido Nítrico neuronal
18. ON – Óxido Nítrico
19. SON – Sintase do Óxido Nítrico
20. TRIS – Trizma base (tris (hydroximetil) amino metano
21. UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
22. VCT – Valor Calórico Total
23.  $\beta$ -NADP –  $\beta$  - Nicotinamida Adenina Di-nucleotídeo Fosfato

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Administração da Arginina por sonda orogástrica.....	34
2. Equipamentos utilizados para reconstrução bidimensional e tridimensional	45
3. Fotomicrografias da borda medial e lateral da área 17.....	55
4. Fotomicrografias de células representando os grupos experimentais.....	56
5. Fotomicrografias ilustrando as varicosidades.....	57

## LISTA DE TABELAS

	Página
1. Quantidades de L-Arginina e L-Histidina administradas nos ratos.....	33
2. Itens de enriquecimento da Ração Labina segundo a Purina do Brasil.....	35
3. Níveis de garantia da Ração Labina segundo a Purina do Brasil.....	36
4. Análise físico-química da amostra da ração Labina (Purina do Brasil)....	37
5. Aminograma da ração Labina.....	38
6. Evolução do peso ponderal dos ratos.....	50
7. Pesos encefálicos dos ratos.....	51
8. Orientação dos dendritos e número de neurônios por corte.....	52
9. Análise do soma e dos dendritos das células.....	53
10. Frequência de ramificação dendrítica.....	54

## RESUMO

Foram investigados os efeitos da administração de L-Arginina a ratos lactentes, associada à manipulação do tamanho da ninhada, sobre o desenvolvimento ponderal e a morfometria de neurônios NADPH-diaforase-positivos do córtex visual primário. Ratos Wistar criados em ninhadas com 6 ou 12 filhotes (respectivamente grupos N6 e N12) foram tratados por gavagem, do 7º ao 28º dia de vida, com L-Arginina (ARG), L-Histidina (HIST) ou água destilada (H<sub>2</sub>O). Um grupo adicional N6 não recebeu qualquer tratamento (Ingênuo). Entre 90-120 dias de vida, os animais foram perfundidos com salina+formol e seus encéfalos submetidos à reação histoquímica para marcação dos neurônios NADPH-d positivos (método indireto da enzima málica). Os pesos corporais e encefálicos dos grupos N12 foram menores que os dos respectivos grupos N6 ( $p < 0.05$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos, com relação à orientação dendrítica e à contagem de neurônios. Nos grupos H<sub>2</sub>O-N6, H<sub>2</sub>O-12, ARG-N6 e ARG-N12 foram analisados: área e perímetro do soma; pontos de bifurcação; dimensão fractal, área e volume total de dendritos, não havendo diferença significativa entre os grupos. O tratamento com Arginina esteve associado com aumento da densidade de varicosidades e frequência de ramificações dendríticas, sugerindo plasticidade, mesmo nos desnutridos. Os resultados indicam ainda que células NADPH-d são resistentes à desnutrição. Os dados são considerados interessantes para estudos de plasticidade sináptica durante o desenvolvimento e seu relacionamento com agentes agressivos como a desnutrição.

## ABSTRACT

The present study investigated the effect of L-Arginine administration in suckling rats, reared in different litter sizes, on body weights and morphometric parameters of NADPH-diaphorase-positive neurons on primary visual cortex. Wistar rats reared in litters with 6 or 12 pups (respectively N6 and N12 groups) received per gavage, from postnatal days 7 to 28, either distilled water (group H<sub>2</sub>O) or L-Arginine (ARG) or L-Histidine (HIST). An additional group was studied without any treatment (ingenuous group – ING). At 90-120 days of life, the animals were perfused with saline+formaldehyde and their brains were processed for histochemical reaction to reveal NADPH-diaphorase-positive neurons following the malic enzyme indirect method. In N12-rats, body and brain weights were smaller when compared to their respective well-nourished groups ( $p < 0,05$ ). Dendritic orientation and total number of neurons were similar in all groups. Soma area and perimeter; as well as dendritic bifurcation points, fractal dimension, area and volume of dendritic field did not show any difference in the 4 groups analysed for these parameters (H<sub>2</sub>O-N6, H<sub>2</sub>O-N12, ARG-N6, ARG-N12). Arginine treatment was associated with increased density of dendrite varicosities and of dendrite branching frequency, suggesting plasticity, even in malnourished rats. The results indicate that NADPH-d cells are resistant to nutritional damage. Data are considered of interest for studies of synaptic plasticity during neural development and its relationships to aggressive agents like malnutrition.

## INTRODUÇÃO

### 1. Nutrição e Sistema Nervoso

Nutrição compreende as transformações que sofrem os alimentos no organismo vivo, incluindo os processos da digestão, absorção, metabolismo (utilização de nutrientes para produção de energia e para as sínteses orgânicas) e reaproveitamento ou a eliminação dos subprodutos do catabolismo (Batista Filho, 1999). Para alcançar um estado nutricional satisfatório é necessária uma alimentação adequada, suficiente em qualidade e quantidade, além de ser harmônica em seus vários constituintes – energia e nutrientes (Batista Filho, 1999). Os nutrientes constituem elementos fundamentais, com os quais o cérebro imaturo vai se desenvolvendo, através dos processos de hiperplasia, hipertrofia, mielinização e organização das sinapses (Guedes e Teodósio, 1993; Guedes e col., 2004).

A deficiência de um ou mais nutrientes, dependendo da intensidade e duração das alterações nutricionais, pode alterar padrões histológicos e bioquímicos dos processos referidos anteriormente, que teriam repercussões nas suas funções (Guedes e col., 2004). As crianças que sofrem de atraso no crescimento como consequência de uma alimentação deficiente e ou de infecções recorrentes são mais vulneráveis a um grande número de enfermidades infecciosas que podem levar à morte. O pouco crescimento também pode estar associado a um atraso de desenvolvimento mental e a deficiências funcionais na vida adulta (Onís e col., 2000).

O termo desnutrição protéico-energética refere-se a uma classe de distúrbios clínicos que resultam de várias combinações e graus de deficiência de proteína e energia, em geral acompanhadas por lesões orgânicas e estresse (Mahan e Escott-Stump, 1998). As principais formas da desnutrição no homem são: marasmo

(deficiência predominante de alimentos que fornecem energia), kwashiorkor (deficiência protéica) e kwashiorkor marásmico com deficiência de proteína e energia. (Mahan e Escott-Stump, 1998).

Em 2000, calculou-se que 32,5% de menores de 5 anos, e cerca de 182 milhões de crianças em idade pré-escolar, dos países em desenvolvimento, sofram atraso de seu desenvolvimento físico (Onís e col., 2000). Houve muitas melhorias neste sentido desde 1980 quando a prevalência mundial estimada era de 50% tendo-se a previsão de que esta proporção venha a diminuir para 29% em 2005 (Onís e col., 2000). Mas esta diminuição não tem sido igual em todos os países do mundo, e apesar das melhorias, os dados confirmam que a desnutrição infantil segue constituindo um sério problema de saúde pública nos países em desenvolvimento (Onís e col., 1993; Onís e col., 2000).

No Brasil, dos meados dos anos 70 ao final dos anos 80 houve uma melhora substancial em vários indicadores de saúde (taxa de mortalidade infantil, desnutrição em crianças e adultos e morbi-mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias) que se continuou nos anos 90 (Monteiro e col., 1997). A melhoria provavelmente ocorreu devido a fatores como aumento da cobertura dos serviços de saúde; educação e saneamento (Monteiro e col., 1997). Embora as mesmas análises tenham ocorrido em todo o país, as mudanças foram menos intensas nas regiões Norte e Nordeste, determinando a exacerbação das desigualdades existentes entre estas regiões e o Centro-Sul do Brasil (Monteiro, 1997; Monteiro e col., 1997). No que diz respeito aos indicadores de morbidade para as doenças crônico-degenerativas, existem poucas informações disponíveis para sua mensuração, visto que não foram desenvolvidos sistemas para o registro destes agravos (Barreto e Carmo, 1994).

São fundamentais os estudos com animais experimentais para estimar a dimensão dos efeitos prejudiciais que a desnutrição pode causar em humanos. Com os

modelos animais, podem-se estabelecer relações causais entre desnutrição precoce e alterações estruturais do sistema nervoso, com as seguintes conseqüências: alterações nos comportamentos e mudanças cognitivas (Levitsky e Strupp, 1995). No entanto, embora estudos com animais sejam de importância extraordinária, é necessário ter cuidado no que se refere à extrapolação, do que é observado em tais modelos, para o homem (Guedes, 1985).

Muitos estudos com modelos animais têm comprovado que a deficiência nutricional no início da vida produz efeitos mais severos sobre o sistema nervoso do que a desnutrição tardia (Araújo, 1998; Borba e col., 2000; Costa-Cruz e Guedes, 2001; Picanço-Diniz e col., 1998; Rocha-de-Melo, 2001). Também estudos em humanos têm demonstrado que há alterações no sistema nervoso central, em indivíduos desnutridos precocemente (Barret e Radke-Yarrow, 1985; Hack e col., 1991).

Os efeitos da desnutrição, no sistema nervoso central, são muito mais severos quando ela coincide com o período de crescimento rápido do cérebro (Dobbing, 1970). Uma agressão neste período acarretaria modificações no número de células (Smart e Dobbing, 1971; Smart, 1990), na concentração cerebral de colesterol (Smart e Dobbing, 1971), tamanho do cérebro, quantidade de lipídios e atividade enzimática (Dobbing e Smart, 1974; Dobbing e Sands, 1985). Além disso, o peso corporal também é afetado (Forbes e col., 1977). Nesta fase, não só há rápido aumento de peso cerebral, mas também eventos como a neurogênese, gliogênese e migração neuronal, atingem a velocidade máxima em cada área cerebral. Neste período há uma maior suscetibilidade do sistema nervoso a agressões, como, por exemplo, a desnutrição. Assim, essa fase também é chamada de período crítico do desenvolvimento (Morgane e col., 1993; Resnick e col., 1979).

Nos seres humanos, estima-se que a aceleração do crescimento cerebral começa no terceiro trimestre de gestação e termina no segundo ou terceiro ano de vida, tendo-se portanto um período pré e outro pós-natal. Este período difere para cada uma das outras espécies animais (Guedes, 1985). No caso do rato, o modelo experimental mais usado para estudar a desnutrição, o padrão temporal compreende apenas o período de aleitamento, ou seja, as 3 primeiras semanas de vida pós-natal, sendo este o modelo experimental mais usado para estudar a desnutrição (Guedes, 1985; Guedes e col., 2004; Levitsky e Strupp, 1995; Morgane e col., 1992; Morgane e col., 1993; Resnick e col., 1979).

Em humanos, a desnutrição pode, dependendo do tempo e severidade, resultar em vários graus de deficiência comportamental e inaptidões de aprendizagem (Morgane e col., 1993; Resnick e col., 1979). Estudos indicam que a desnutrição, especialmente no período pré-natal, é um importante fator principal não genético que influencia o sistema nervoso central em desenvolvimento e, em última instância, a performance intelectual. Uma provisão apropriada de nutrientes essenciais é uma necessidade para a manutenção de crescimento de todos os órgãos como também para o desenvolvimento normal de suas funções fisiológicas. A dieta no início da vida tem efeitos a longo prazo na estrutura e função do sistema nervoso, sensorio e habilidades cognitivas bem como no comportamento (Koletzko e col., 1998).

Na desnutrição as estruturas mais afetadas no período de desenvolvimento crítico cerebral são o giro denteado da formação hipocampal, cerebelo e bulbo olfatório (Morgane e col., 1993). Estudos histológicos, comportamentais e neurofisiológicos indicam que a maioria das alterações no crescimento de várias estruturas cerebrais eventualmente pode se recuperar, embora alterações no hipocampo e cerebelo possam se manter permanentemente (Levitsky e Strupp, 1995). Há trabalho comprovando que

mudanças morfométricas permanentes e transitórias podem ocorrer no córtex visual de ratos desnutridos no início da vida e depois alimentados com dieta normal (Borba e col., 2000). Há também informações de que pequenos episódios de desnutrição, durante o período de amamentação, podem afetar o desenvolvimento corporal e cerebral, bem como a susceptibilidade ao fenômeno da depressão alastrante cortical em ratos adultos, sendo a terceira semana de vida o período em que o cérebro é mais sensível à desnutrição (Rocha-de-Melo e Guedes, 1997). Além disto há também estudos comportamentais, eletrofisiológicos demonstrando alterações no cérebro, como consequência da desnutrição (Levitsky e Strupp, 1995; Picanço-Diniz e col., 1998).

O modelo experimental que tem sido usado em alguns trabalhos com ratos, é a desnutrição causada por aumento do tamanho das ninhadas. Essa condição de desnutrição é provocada aumentando-se o número de filhotes a serem amamentados por uma única mãe. Assim a quantidade de leite recebido por cada filhote é insuficiente, levando a alterações no funcionamento, morfologia e distribuição neuronais sendo então modificado o estado nutricional dos filhotes recém-nascidos (Costa-Cruz e Guedes, 2001; De Luca e col., 1977; Rocha-de-Melo, 2001; Santos-Monteiro, 2002).

## **2. L-Arginina, Óxido Nítrico e Sistema Nervoso**

Os aminoácidos estão envolvidos, dentre outras funções na síntese de proteínas teciduais (Mahan e Escott-Stump, 1998). Em um organismo normal, os 20 aminoácidos conhecidos são combinados das mais variadas maneiras para sintetizar as suas diferentes proteínas. A ingestão inadequada desses aminoácidos pode levar a um desequilíbrio no balanço nitrogenado, perda de peso, crescimento prejudicado em bebês e crianças além de outros sinais clínicos (Mahan e Escott-Stump, 1998). No caso da

Arginina e da Citrulina sabe-se, desde muito tempo, que estão envolvidas na síntese da uréia no fígado (Mahan e Escott-Stump, 1998).

Há controvérsias quanto a Arginina ser essencial ou não-essencial. Alguns autores chamam-na de aminoácido condicionalmente essencial, isto porque, há estudos indicando que a produção de Arginina pelo organismo, durante o período de crescimento, assim como durante estresse fisiológico, não seria suficiente, sendo necessário supri-la com a ingestão dietética (Nieves Jr. e Langkamp-Henken, 2002). A homeostase da concentração de L-Arginina no sangue é regulada pela ingestão dietética, síntese e metabolismo, bem como pelo turnover de proteínas (Böger e Bode-Böger, 2001).

A Arginina tem várias rotas metabólicas no organismo, além do ciclo da uréia. Atua na síntese de proteínas, é usada na síntese da creatina e de poliaminas (Nieves Jr. e Langkamp-Henken, 2002), como também na síntese do óxido nítrico (ON). Knowles (1989) refere que o ON é formado na atmosfera, a partir de nitrogênio e oxigênio. Biologicamente, sua síntese ocorre em uma reação, catalisada pela enzima Sintase do Óxido Nítrico (SON), entre a L-Arginina e o oxigênio molecular, em células e tecidos de mamíferos (Rocha-de-Melo, 2001).

O ON tem importante função como mensageiro neuronal (Garthwaite e col., 1988), além de seu papel como fator de relaxamento derivado do endotélio descrito por Furchgott & Zawadzki em 1980 (Moncada e col., 1989) . Depois destes trabalhos muitos outros experimentos indicam várias funções do ON, tais como: atua como um neurotransmissor não adrenérgico e não colinérgico no intestino e nos vasos sanguíneos cerebrais; parece ter papel chave na morfogênese e plasticidade sináptica; potenciação a longo-prazo no hipocampo e depressão a longo-prazo no cerebelo, duas formas de modulação sináptica que podem estar envolvidas na aprendizagem e memória, podem

ser regulada pelo ON, dentre outros (Dawson e Dawson, 1996; Prast e Philippu, 2001). O ON pode contribuir para plasticidade sináptica como um mediador retrógrado que é liberado pela ativação do receptor NMDA pós-sináptico (Paakkari e Lindsberg, 1995). A produção do óxido nítrico é um passo chave para muitas fases precoces da neurogênese, tal como proliferação de células neuronais e sua migração. (Moreno e col., 2002)

A biosíntese do ON é realizada a partir do fato da SON converter a L-Arginina para ON e L-Citrulina em um processo que consome 5 elétrons. Existem 3 isoformas: a neural (nSON), endotelial (eSON) e a induzida por macrófago (iSON). Ambas as isoformas neuronal e endotelial são expressadas constitutivamente e ativadas brevemente pelo aumento do cálcio intracelular ligando-se a calmodulina (Dawson e Dawson, 1996; Nieves Jr. e Langkamp-Henken, 2002). A iSON não é detectada em condições normais, mas em presença de uma agressão ao sistema imunológico citocinas e lipopolissacarídeos conduzem à expressão da iSON. A regulação da nSON e eSON ocorre pelo controle de níveis de vários cofatores e substratos necessários dentro da célula, assim como através de modificações de enzimas (Dawson e Dawson, 1996). É importante dizer que todas as formas da SON usam Arginina como seu substrato, forma estequiometricamente citrulina com ON, e requer nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como um doador de elétrons (Bredt e Snyder, 1992). Também há estudos que indicam substâncias, como por exemplo a N<sup>G</sup>-monometilarginina (L-NMMA), capazes de inibir a ação da SON (Bredt e Snyder, 1992).

O ON funciona como um neurotransmissor atípico; não é estocado em vesículas sinápticas, parece ser sintetizado de acordo com a demanda (Snyder, 1992; Bredt e Snyder, 1992). O ON não é liberado por excitação e não atua sobre proteínas receptoras

em membranas neuronais; ele difunde-se de um neurônio para outro (Snyder, 1992; Bredt e Snyder, 1992).

Trabalhos referem que o ON em altas concentrações pode ter um papel patológico em desordens inflamatórias do sistema nervoso central, e também contribuir para a patogênese das doenças neurodegenerativas tal como doença de Alzheimer e de Huntington (Dawson e Dawson, 1996; Paakkari e Lindsberg, 1995). Há estudos indicando que, na presença de altos níveis de glutamato, neurônios que contêm a enzima SON se comportam como macrófagos, liberando grande quantidade de ON para matar neurônios próximos (Bredt e Snyder, 1992). As propriedades tóxicas do ON parecem ser usadas pelo sistema imune para matar ou diminuir o crescimento de organismos invasores (Marletta e Spiering, 2003).

A SON neuronal (nSON) é ativada pelo aumento intracelular de cálcio, que subsequente mente liga-se à calmodulina para ativar a enzima, assim iniciando a função do ON no sistema nervoso central (Dawson e Dawson, 1996; Snyder, 1992). Evidências indiretas sugerem que o glutamato, atuando ligado ao subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) do receptor de aminoácido excitatório, é o sinal ativador principal para a SON no cérebro (Paakkari e Lindsberg, 1995). A nSON é a maior isoforma no cérebro. É colocalizado com neurônios nicotinamida adenina di-nucleotídeo fosfato diaforase (NADPH-d) (Dawson e Dawson, 1996; Snyder, 1992).

### **3. NADPH-diaforase e sintase do óxido nítrico**

A técnica histoquímica da NADPH-d foi primeiro descrita no início de 1961 por Thomas e Pearse, que relataram neurônios corados de azul escuro na presença de nitroblue tetrazolium (Dawson e Dawson, 1996). O método histoquímico foi

aperfeiçoado por Scherer-Singler e colaboradores, 20 anos depois (Franca e col., 2000). Depois deles muitos estudos foram realizados e descobriu-se que a histoquímica NADPH-d permite identificar o corpo celular, dendritos e uma parte inicial dos axônios de um pequeno subgrupo de neurônios intracorticais que são muito resistentes a várias doenças neurotóxicas e neurodegenerativas (Picanço-Diniz e col., 1998). No córtex cerebral, só 1 a 2% de células neuronais são positivas para SON e invariavelmente positivas para NADPH-diaforase (Bredt e Snyder, 1992). Isto já foi observado tanto em ratos como em macacos (Bredt e Snyder, 1992).

Dados morfológicos indicam que os neurônios que expressam tal enzima são células não-piramidais GABA-érgicas (Franca e col., 2000). A morfologia das células intensamente marcadas para NADPH-d é bem variada (Leigh e col., 1990).

Os neurônios marcados por NADPH-d ou imunohistoquímica da enzima sintase do óxido nítrico (SON) podem ser subdivididos em 2 categorias: tipo I e II. Os tipo I, são intensamente corados, correspondem a cerca de 2% de todos os neurônios corticais e estão presentes em todos os tipos de vertebrados estudados até hoje. De maneira geral, neurônios tipo I NADPH-d não são homoganeamente distribuídos no isocórtex dos mamíferos. Várias espécies de mamíferos apresentam um modelo de distribuição tangencial de neurônios tipo I, mas não foi observada a distribuição laminar de forma similar em todas as espécies. Os do tipo II são mais numerosos, corando muito pouco o corpo celular e pouco ou nenhum prolongamento (Franca e col., 2000).

A histoquímica da NADPH-diaforase tem sido usada para marcar neurônios cerebrais específicos que contém esta enzima e que reagem com neurônios produtores de óxido nítrico. É uma técnica que pode então servir como um instrumento onde neurônios marcados são passíveis de serem mensurados permitindo assim manipular condições como, por exemplo, estado nutricional, e com isto verificar variáveis que

afetariam o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso (Araújo, 1998; Borba e col., 2000; Rocha-de-Melo, 2001). Apesar de em várias espécies de mamíferos ter-se observado que a densidade celular no córtex somatosensório é significativamente mais alta que no córtex visual (Franca e col., 2000).

O córtex visual primário é a área 17 de Brodmann, também chamada de V1 e córtex estriado. Está localizado no lobo occipital do cérebro (Bear e col., 2002). Em primatas, a maior parte desta área localiza-se na superfície medial do hemisfério ao redor do sulco calcarino (Bear e col., 2002). O córtex estriado apresenta corpos neuronais organizados em seis camadas que são designadas por algarismos romanos (Bear e col., 2002).

Esta área parece ser muito sensível a alterações nutricionais, podendo sofrer mudanças morfológicas. Assim, a área 17 tem sido escolhida, em alguns trabalhos, para o estudo dos efeitos da desnutrição sobre o padrão histoquímico dos neurônios contendo a NADPH-d (Borba e col., 2000; Picanço-Diniz e col., 1998; Rocha-de-Melo, 2001).

Quanto à localização destas células marcadas pela NADPH-d, já foram descritas em vários animais como, por exemplo: pombos (Atoji e col., 2001), mamíferos (Franca e col., 2000), anfíbios (Moreno e col., 2002) e peixes (Devadas e col., 2001). Tais células estão presentes no cérebro (Franca e col., 2000), cerebelo (Bredt e Snyder, 1992), medula (Atoji e col., 2001) e retina (Devadas e col., 2001).

Em macacos foi observado uma atividade da neurópila NADPH-d com uma distribuição heterogênea e em cortes coronais existe um padrão laminar (Franca e col., 1997). A histoquímica revela 2 tipos celulares, sendo estes neurônios células não-piramidais, com arborização dendrítica bem corada e com morfologia diferentes, mas axônios pouco marcados especialmente na substância cinzenta (Franca e col., 1997). Na

substância branca as células apresentavam-se com morfologia mais homogênea (Franca e col., 1997).

Existem diversos trabalhos relatando uma visão geral da distribuição e morfologia dos neurônios NADPH-d positivos em cérebros de ratos (Araújo, 1998; Franca e col., 2000; Leigh e col., 1990). Também há estudos em outras espécies de mamíferos, como macacos e marsupiais onde as células marcadas foram mais freqüentes nas camadas II e III da substância cinzenta e substância branca (Sandell, 1986). Foram identificadas células tipo I e II em *Didelphis aurita*, *Monodelphis domestica* e *Callithrix jacchus* (Franca e col., 2000). Em ratos, só foi identificado o tipo I e, neste animal, a camada infragranular tem densidade mais alta de células NADPH-d positivas do que a camada IV (Franca e col., 2000).

Como já foi mencionado anteriormente, muitos estudos clínicos e experimentais comprovam que a deficiência nutricional produz efeitos severos sobre o sistema nervoso quando este ocorre no início da vida. Neste período, caso o cérebro não obtenha uma nutrição adequada, em quantidade e qualidade, terá alterações na sua estrutura e função, muitas das quais dificilmente serão revertidas por completo. Os nutrientes vão promover o desenvolvimento e a manutenção do funcionamento cerebral adequado. Neste trabalho manipulamos, no rato, a quantidade de L-Arginina ingerida pelos filhotes e o tamanho da ninhada no intuito de investigar as alterações morfológicas que esses fatores podem provocar no Sistema Nervoso Central. A escolha da L-Arginina ocorreu devido ao fato dela estar envolvida em várias rotas metabólicas, dentre as quais a produção do óxido nítrico, através da enzima SON. Este é mais um passo que pretendemos dar no sentido do conhecimento da interação nutrição-cérebro.

## JUSTIFICATIVA

Inúmeros estudos clínicos e experimentais indicam que um estado nutricional satisfatório, advindo de uma alimentação adequada, desde o início da vida, é fundamental para o desenvolvimento e funcionamento cerebrais. Estudos em populações humanas indicam melhoria de vários indicadores de saúde dessas populações. No entanto, a desnutrição infantil ainda é um problema de saúde pública em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. Isto torna atual estudos que visem compreender melhor a integração cérebro-nutrição diante deste quadro. Muitas pesquisas têm demonstrado que a deficiência nutricional pode causar várias alterações no funcionamento e estrutura do sistema nervoso; principalmente quando ocorre no início da vida. Apesar dos esforços contínuos, ainda se está distante de conhecer por completo o papel que cada nutriente desempenha no sistema nervoso central. No intuito de colaborarmos com esta área de conhecimento, resolvemos estudar que fatores morfológicos poderiam ser alterados no sistema nervoso central de ratos que foram submetidos à manipulação da ninhada e aumento da quantidade de L-Arginina no início da vida. A Arginina tem sido associada a vários processos metabólicos incluindo a síntese do óxido nítrico. Este tem sido o elemento de muitas pesquisas, porém não existe conclusão definitiva sobre seus possíveis efeitos neuroprotetor e neurodegenerativo. Assim sendo, o presente trabalho visa contribuir para o avanço do conhecimento das relações entre ingestão de Arginina, estado nutricional e funções neurais.

## **HIPÓTESES**

- A administração de L-Arginina a ratos lactentes, associados à manipulação do tamanho da ninhada, induz a alterações sobre a sua curva de desenvolvimento ponderal.
- Na idade adulta, o tratamento acima mencionado provoca mudanças relacionadas a morfometria de neurônios NADPH-diaforase-positivos do córtex visual primário.

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo Geral**

Investigar, em ratos, os efeitos da administração precoce de L-Arginina, associada à manipulação do tamanho da ninhada, sobre o desenvolvimento ponderal e a morfometria de neurônios NADPH-diaforase-positivos do córtex visual primário, esta última analisada na idade adulta.

### **2. Objetivos Específicos**

- Determinar a evolução do peso corporal dos filhotes ao longo do seu desenvolvimento.
- Quando os filhotes se tornarem adultos,
  - Mensurar o peso do encéfalo após perfusão;
  - Avaliar bidimensionalmente os seguintes parâmetros morfométricos:
    1. Número total de neurônios NADPH-d positivos no córtex visual primário do hemisfério esquerdo;
    2. Orientação dendrítica ;
  - Avaliar tridimensionalmente os seguintes parâmetros morfométricos:
    1. Área e perímetro do corpo celular
    2. Área do campo dendrítico
    3. Volume do campo dendrítico
    4. Densidade de varicosidades dendríticas
    5. Dimensão fractal da arborização dendrítica

6. Frequência de distribuição dos ramos dendríticos
7. Número de pontos de bifurcação dos ramos dendríticos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Obtenção dos animais

Foram utilizados 68 ratos do sexo masculino, da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco. Antes do início do trabalho, o projeto foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco; tendo sido aprovado (Anexo 1).

Como forma de reduzir custos e evitar o uso de maior quantidade de animais, os ratos desta dissertação (com exceção dos grupos ING (“ingênuos”); definidos adiante) foram compartilhados com a aluna deste Mestrado da UFPE Marília Ferreira Frazão (Frazão, 2004).

Os animais foram obtidos a partir de fêmeas com peso superior a 200g e com idade entre 90 e 180 dias. O acasalamento ocorreu por 1 semana, colocando-se em uma mesma gaiola 2 fêmeas com 1 macho. Passado este período o macho era retirado. Depois de diagnosticada a gravidez, através do aumento do peso e desenvolvimento do ventre, a fêmea era colocada em uma gaiola maternidade até o fim da gestação. Após o parto, quando os filhotes completavam 24 horas de nascidos foram identificados quanto ao sexo. Nesse momento também o tamanho da ninhada era manipulada para conter 6 e 12 filhotes por mãe dependendo do grupo experimental a que, aleatoriamente, o animal pertenceria. Desta maneira, os animais foram divididos em 7 grupos de acordo com as seguintes condições experimentais:

**Grupo ING-N6;** n= 10 Animais que durante o período de lactação foram criados em ninhadas de 6 filhotes por mãe, sem qualquer outro tratamento;

**Grupo ING-N12;** n= 10 Animais que durante o período de lactação foram criados em ninhadas de 12 filhotes por mãe, sem qualquer outro tratamento;

**Grupo ARG-N6;** n= 10 Animais que durante o período de lactação foram criados em ninhadas de 6 filhotes por mãe, e adicionalmente submetidos, por 3 semanas (do 7<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia), à administração, de solução aquosa contendo o aminoácido L-Arginina por sonda orogástrica.

**Grupo ARG-N12;** n= 10 Animais que durante o período de lactação foram criados em ninhadas de 12 filhotes por mãe, e adicionalmente tratados com L-Arginina, como descrito para o grupo anterior.

**Grupo H<sub>2</sub>O-N6;** n= 10 Animais que durante o período de lactação foram criados em ninhadas de 6 filhotes por mãe, e submetidos, nas 3 semanas descritas acima, à administração, de água destilada por sonda orogástrica.

**Grupo H<sub>2</sub>O-N12;** n= 10 Animais que durante o período de lactação foram criados em ninhadas de 12 filhotes por mãe, e adicionalmente tratados com água destilada por sonda orogástrica, como descrito para o grupo anterior.

**Grupo HIST-N6;** n= 8 Animais que durante o período de lactação foram criados em ninhadas de 6 filhotes por mãe, e submetidos, por 3 semanas, à administração, de solução aquosa contendo o aminoácido L-Histidina por sonda orogástrica.

A L-Arginina foi fabricada pela empresa Sigma-Aldrich e a L-Histidina pela Vetec, sendo ambas com apresentação em pó, solúvel em água. A escolha da L-Histidina (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) foi pelo fato de que este aminoácido seria mais um controle, visto que ele contém uma quantidade de nitrogênio próximo à da L-Arginina (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), e não tem relação com a produção de óxido nítrico.

As quantidades de L-Arginina e L-Histidina (tabela 01) a serem administradas, foram calculadas com base no peso corporal médio dos filhotes em cada semana de

acordo com as recomendações da AIN (1993) (Reeves e col., 1993). Isto porque não foi encontrada uma recomendação nutricional de aminoácidos para ratos na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, e 4<sup>a</sup> semana de vida. A partir da recomendação de 4,5 g de Arginina/Kg de dieta para ratos adultos, com peso médio de 300g, obtida na AIN-93M (Reeves e col., 1993) e estimando um consumo diário de 20g de dieta/rato/dia, obtivemos uma média de consumo diário de Arginina de 90mg por rato adulto. Utilizando esta quantidade base de Arginina/dia para um rato adulto, fez-se então uma regra de três simples para estimar o consumo de um filhote com 10g (peso médio do filhote na primeira semana de lactação) e 30 g (peso médio do filhote no início da terceira semana de lactação). Obtendo-se então o consumo médio de Arginina no início da vida (3mg/dia) e terceira semana de vida do rato (9mg/dia). Desta maneira buscamos oferecer quantidades adicionais de L-Arginina e L-Histidina conforme descrito na tabela 1.

**Tabela 01: Quantidades de L-Arginina e L-Histidina, bem como volumes de água destilada em que elas foram dissolvidas e administradas, via gavagem, nos ratos experimentais, com base no peso corporal médio dos animais e nas recomendações da AIN-93, para manutenção de animais adultos**

Semana de Tratamento	Quantidade de L-Arginina	Quantidade de L- Histidina	Volume de água
1 <sup>a</sup>	5 mg	7 mg	0,5 ml
2 <sup>a</sup>	10 mg	14 mg	1,0 ml
3 <sup>a</sup>	20 mg	28 mg	1,0 ml

O preparo diário das soluções era realizado minutos antes da administração das mesmas. Os aminoácidos eram pesados em balança analítica Bosch, Modelo S-2000, com capacidade máxima de 200g e sensibilidade de até 0,1 mg.

A administração das soluções por sonda orogástrica (figura 01), era realizada sempre no mesmo horário, entre as 12 e 14 horas. Para introdução da sonda era realizada a contenção manual do filhote evitando que ele se movimentasse. Com o auxílio dos dedos indicador e polegar da mão esquerda, o filhote era contido e posicionado verticalmente, tendo a cabeça levemente repuxada para trás, deixando-a assim plana a curvatura anatômica entre o tórax e boca. Com o filhote assim contido, a sonda era introduzida adequadamente na cavidade oral usando a mão direita. A sonda era de polietileno, flexível, de calibre pequeno (0,5 mm de diâmetro interno e cerca de 15 cm de comprimento), conectada na agulha de uma seringa de vidro com capacidade de 1,0 ml. A extensão da sonda era mensurada e demarcada antes da introdução da mesma para facilitar sua penetração até a porção inferior da cavidade gástrica. A introdução do líquido no estômago do animal era realizada lentamente evitando-se bolhas de ar, sendo então minimizada a distensão gástrica.

**Figura 01: Administração de Arginina por sonda orogástrica em rato Wistar na segunda semana de vida**



## 2. Alimentação dos animais

A dieta “Labina”, com 23% de proteína, foi usada para manutenção da mãe, antes e durante a gestação, no período de amamentação e como dieta dos filhotes depois do desmame. Segundo o fabricante (Purina do Brasil Ltda) a composição básica da dieta “Labina” é: carbonato de cálcio, farelo de soja, farelo de trigo, feno de alfafa, fosfato bicálcico, milho integral moído, óleo de soja degomado, cloreto de sódio (sal comum), pré-mix vitamínico mineral, farinha de peixe. Os eventuais substitutivos são: Farelo de arroz, farelo de arroz desengordurado, farelo de glúten de milho, farelo de soja integral (grãos tostados), quirera de arroz, etoxiquin, gordura vegetal estabilizada, farinha de trigo. O fabricante em sua embalagem refere a lista de itens de enriquecimento além do nível de garantia do produto. (tabelas 02 e 03).

**Tabela 02: Itens de enriquecimento por Kg da ração Labina com suas respectivas quantidades descritas segundo a Purina do Brasil.**

<b>Item de enriquecimento</b>	<b>Quantidade por Kg</b>
Ácido Fólico	14,00 mg
Antioxidante	150,00 mg
Biotina	0,20 mg
Cobalto	2,00 mg
Cobre	30,00 mg
Colina	2800 mg
Ferro	180,00 mg

Iodo	2,00 mg
Manganês	110,00 mg
Niacina	242,00 mg
Selênio	0,20 mg
Pantotenato de Cálcio	100,00 mg
Piridoxina	12,00 mg
Tiamina	12,00 mg
Vitamina A	28000 UI
Vitamina B12	44,00 mcg
Vitamina B2	28 mg
Vitamina D3	4.400,00 UI
Vitamina E	90,00 UI
Vitamina K	7,00 mg
Zinco	110,00 mg

**Tabela 03: Níveis de garantia da Labina segundo a Purina do Brasil**

<b>Análise</b>	<b>Percentual de garantia</b>
Umidade (máx.)	13,0%
Proteína Bruta (mín.)	23,0%
Extrato Etéreo (mín.)	4,0%
Matéria fibrosa (máx.)	8,0%
Matéria mineral (máx.)	10,0%

Cálcio (máx.)	1,5%
Fósforo (mín.)	0,8%

Uma amostra dessa ração foi submetida para análise físico-química no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade de Pernambuco (tabela 04). E para ter certeza da quantidade de aminoácidos contidos na ração foram enviadas 2 amostras da mesma para realização do aminograma no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (tabela 05).

**Tabela 04: Análise físico-química da amostra da ração Labina (Purina do Brasil) realizada no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco**

Ensaio	Resultados
Umidade (g/100g) - Método: Adolfo Lutz, 1985	9,08
Cinzas (g/100g) - Método: AOAC 1998. Ref. 930.22	6,60
Proteínas (g/100g) - Método: AOAC 1998. Ref. 991.20	23,27
Lipídeos (g/100g) - Método: AOAC 1998 Ref. 963.15	4,24
Carboidratos (g/100g) - Método por cálculo	56,81
VCT (Kcal/100g) - Método por cálculo	358,48

**Tabela 05: Aminograma da ração Labina (fabricada pela Purina do Brasil), realizado pelo Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os resultados estão expressos em g por Kg da amostra.**

<b>AMINOÁCIDO</b>	<b>Amostra A</b>	<b>Amostra A</b>	<b>Amostra B</b>	<b>Amostra B</b>	<b>MÉDIA</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	
Lisina	12,27	12,23	12,01	12,11	12,16
Histidina	5,89	5,67	5,55	5,64	5,69
Arginina	14,20	14,00	13,46	13,79	13,86
Ac. Aspártico	24,44	24,58	23,27	23,67	23,99
Treonina	9,71	9,65	9,20	9,31	9,47
Serina	11,35	11,36	11,00	10,88	11,15
Ac. Glutâmico	40,33	40,41	38,19	38,67	39,40
Prolina	13,98	14,01	13,02	13,24	13,56
Glicina	10,07	10,20	9,85	9,89	10,00
Alanina	11,13	10,93	11,17	11,35	11,15
1/2 Cistina	2,68	2,60	2,12	2,19	2,40
Valina	9,27	9,28	10,43	10,22	9,80
Metionina	2,80	2,85	3,45	3,64	3,19
Isoleucina	7,98	8,49	9,09	9,06	8,66
Leucina	17,22	17,25	18,31	18,70	17,87
Tirosina	5,64	6,44	7,00	7,16	6,56
Fenilalanina	10,83	10,97	11,60	11,40	11,20
Qtd.Hidr (mg)	11,14	10,80	11,15	10,40	10,87
No. Análise	32360	36364	32362	32363	

Os filhotes foram desmamados aos 25 dias de vida e, após o desmame, mantidos acomodados de 4 a 6 animais por gaiolas.

As gaiolas utilizadas para o período de gestação e aleitamento dos filhotes foram plásticas medindo 51X35,5X18,5 cm, recoberta por grade de metal. Para manutenção dos animais até atingirem a idade adulta foram utilizadas, além das plásticas, as gaiolas de metal com 42X28,5X20 cm. Os animais foram mantidos em biotério com ciclo “claro-escuro” de 12/12 horas (luz das 6 às 18 horas) e com a temperatura controlada em  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Os ratos tinham acesso livre, de acordo com sua vontade à água filtrada e ao alimento.

### **3. Controle do peso corporal e peso encefálico**

Os animais tiveram o peso corporal registrado aos 7, 14, 21, 25, 30, 60 e 90 dias de vida, em balança eletrônica (Marte, Mod.1001, com capacidade para 1610 g e sensibilidade até 0,1 g). O peso encefálico foi medido no dia da perfusão, como descrito abaixo. O registro dos pesos de cada animal foi realizado em protocolo individual.

### **4. Procedimento cirúrgico para perfusão**

Quando adultos (com idade mediana de 91 dias; sendo a idade mínima 90 e a idade máxima 119 dias), foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 1 g/Kg de uretana + 40 mg/Kg de cloralose. Em seguida, submetidos à trepanação do crânio e ao registro da Depressão Alastrante Cortical (DA), no hemisfério direito, na região parietal. A análise eletrofisiológica da DA fez parte da dissertação de Marília Ferreira Frazão (Frazão, 2004), conforme referido anteriormente. Ao final do registro, no mesmo dia, os animais receberam uma dose suplementar de anestésico (em geral, mais 1/3 da dose inicial), sendo em seguida submetidos à abertura do abdômen e do tórax, cortando-se

lateralmente as costelas, até que o coração ficasse completamente exposto. Injetou-se heparina (liquemine; 0,1 ml por animal) no ventrículo esquerdo. Clampeou-se a aorta descendente e foi introduzida uma cânula no mesmo ventrículo, pela qual, após a retirada do ar do sistema, foram injetados os líquidos da perfusão (solução salina, seguida de formol a 10% diluído em solução salina). Para isso, foi usado um compressor que injetava os líquidos pela cânula sob a pressão de  $100 \pm 10$  mmHg. Em seguida foi feito um corte no átrio direito, para a saída do sangue e das soluções de perfusão, que retornavam da circulação. A perfusão com salina durou até que todo o sangue tivesse saído pela abertura do átrio direito, e começasse a sair a solução salina que estava sendo injetada. Em geral, aproximadamente 200 a 300ml de salina foram injetados. Em seguida houve a perfusão com formol a 10% (200 a 300ml). Quando se verificou a rigidez dos membros superiores e da cabeça, a perfusão foi concluída. Para a subsequente retirada do encéfalo, foram realizadas duas incisões, sendo uma anterior, no limite entre os hemisférios cerebrais e o bulbo olfatório, excluindo-o, e a outra incisão era realizada, posteriormente, tangenciando a borda inferior do cerebelo, incluindo-o. A dura-máter foi então removida e o encéfalo retirado, tendo-se cuidado para não lesá-lo. O hemisfério direito (que foi submetido à DA) foi marcado com um corte lateral, ao nível do sulco rinal, em toda a sua extensão antero-posterior. Cada encéfalo foi pesado em balança analítica, modelo Bosh S-2000, com sensibilidade de até 0,1 mg.

Após a sua pesagem, o encéfalo foi guardado em tampão fosfato (0,1M pH 7,2-7,4), seguindo para o processamento histológico nas próximas 24 horas.

## 5. Processamento histológico do cérebro

O cérebro foi cortado (espessura de 150  $\mu\text{m}$ ) e os cortes processados para marcação histoquímica dos neurônios que contém a enzima NADPH-diaforase. Os cortes foram feitos com o cérebro imerso em tampão fosfato a 0,1M e as secções também foram coletadas nesta solução. Foi usado um vibrátomo (Sectioning System Series 1000). Foram realizados cortes em planos coronais, usando a velocidade 2,0 e amplitude 8,0 do vibrátomo.

A reação histoquímica foi realizada segundo o protocolo utilizado no LAFINNT. Este protocolo segue o método indireto da enzima málica (Scherer-Singler e col., 1983), obedecendo as seguintes etapas: os cortes foram inicialmente lavados três vezes, por 15 minutos, sob agitação, com solução de TRIS 0,1M (pH 8,0). O pHmetro utilizado nas análises foi o modelo RH-10. Em seguida foram incubados flutuando livremente sob agitação e em temperatura ambiente, em uma solução contendo: 50 ml de tampão TRIS a 0,1M com pH em torno de 10, 300 mg de ácido málico, 15 mg de nitrobluetetrazolium, 0,5 ml de dimetilsulfóxido, 12 mg de cloreto de manganês, 50 mg de  $\beta$ -NADP e 1,5 ml de triton X-100. A evolução da reação histoquímica foi acompanhada, a intervalos de 1 hora, por meio da observação dos cortes, em microscópio óptico (modelo Standard 25; Zeiss). O critério para a interrupção da reação foi a visualização dos ramos dendríticos de terceira ordem e de ordens superiores nas células marcadas. Esta interrupção ocorreu  $4 \pm 1\text{h}$  após o início da reação. Após essas etapas, os cortes foram novamente lavados 3 vezes, por 15 minutos, sob agitação, com solução TRIS 0,1M (pH 8,0), conforme descrito anteriormente.

Os cortes histológicos foram então montados em lâminas de vidro previamente gelatinizadas e em seguida desidratados, passando-os por uma bateria de etanol e xileno.

Para preservação do material, os cortes eram recobertos com Entelan e em seguida protegidos por uma lamínula de vidro.

## **6. Análise microscópica**

De cada grupo de 10 animais, foram utilizados 5 ratos para a análise microscópica, perfazendo um total de 35 animais. Com o uso do microscópio óptico (Zeiss) foi possível selecionar dentre as preparações histológicas de cada animal as que continham a área visual primária. Para localização dos limites do córtex visual primário foram utilizados o atlas das coordenadas estereotáxicas do cérebro do rato para identificação da área 17 (Paxinos e Watson, 1998); e os critérios de laminação das camadas, revelada pela histoquímica da NADPH-d na neurópila de acordo com Borba e col. (2000).

Todos os cortes dos 35 animais selecionados aleatoriamente, que continham a área 17 foram utilizados para realizar a contagem total de neurônios NADPH-d marcados positivamente no hemisfério esquerdo. Foi utilizada uma câmara clara (ganho:1,1 x) acoplada ao microscópio em pequeno aumento (ocular 8 x e objetiva 4 x). Com a preparação histológica focalizada no microscópio os contornos da área 17 foram desenhados, através da câmara clara, em um papel milimetrado. Desta maneira, as posições das células foram marcadas no desenho e depois as mesmas foram contadas. Ao contrário da substância cinzenta, onde todas as células foram contadas, na substância branca contou-se apenas as células situadas numa faixa de 0,5 centímetro imediatamente adjacente à substância cinzenta.

Para a reconstrução bidimensional foram desenhadas 217 células ao todo. As células foram selecionadas aleatoriamente (entre o Bregma -5,80mm e -7,30mm) de cada rato, sendo 30 desenhos dos grupos: H<sub>2</sub>O-N6, ING-N12, ING-N6 e HIST-N6; 31

desenhos do grupo H<sub>2</sub>O-N12; e 33 reconstruções dos grupos: ARG-N6 e ARG-N12. O critério de escolha destas células foi que estivessem localizadas na área visual primária, estivessem isoladas e sem dendritos primários cortados. Foi escolhido um número igual de células do hemisfério direito e esquerdo, assim como de células das camadas supra-granulares e infra-granulares.

As células diaforase-positivas foram reconstruídas bidimensionalmente com o uso de microscópio óptico e câmara clara (figura 02). Foi usado um microscópio Standard 25 da Zeiss com uma objetiva de imersão de 100 x de aumento e a câmara clara com 8 x de aumento. A imagem da célula foi desenhada em papel ofício. Com o auxílio dos desenhos, foram realizadas medições e análises das características morfométricas bidimensionais.

A tendência de orientação da ramificação dendrítica foi analisada usando o método dos “Círculos de Scholl” (1955) modificado por Friedlander e col. (1981). Essa tendência indica o grau de simetria ou de assimetria dos ramos dendríticos em relação aos círculos de Scholl, quando o corpo celular é localizado no centro dos círculos (mantida a orientação do soma em relação à superfície cortical). Os “Círculos de Sholl” são constituídos de círculos concêntricos com distância de 50 µm entre eles, divididos em 4 quadrantes, sendo 2 verticais e 2 horizontais. Foi contado o número de vezes em que havia interseções dos dendritos com os círculos, em cada quadrante. Diferenças significativas, entre os quadrantes, no número de intersecções, indicariam distribuição assimétrica da ramificação dendrítica.

Para a análise tridimensional, as mesmas células analisadas bidimensionalmente (n=120), dos grupos ARG-N6, ARG-N12, H<sub>2</sub>O-N6 e H<sub>2</sub>O-N12 foram digitalizadas (redesenhadas em computador). Para isto foi usado um computador com a CPU ligada a 2 monitores, teclado e mouse, além do “nobraK” (Nikon) e um microscópio (Nikon)

com objetiva de imersão de 60 x, ocular de 10 x e platina motorizada, além de uma câmara clara (Nikon Drawing tube 1,25 x de aumento) (figura 02). As células foram digitalizadas com o uso do programa de computador “Neurolúcida” versão 5.04 e depois analisadas no programa “Neuroexplorer”. Neste programa, automaticamente, foi calculado área e perímetro do corpo celular. Quanto à arborização dendrítica foram medidas a área total, o volume total, o número total de varicosidades, o comprimento dendrítico total, a dimensão fractal, a frequência de ordem dendrítica e os pontos de bifurcação.

Para realização das fotomicrografias foi utilizado um microscópio binocular acoplado a uma máquina fotográfica digital (Nikon). Foram fotografadas células de todos os grupos, com objetiva de 40 x, utilizando iluminação sem condensador e filtro de correção azul. Para as fotomicrografias da margem medial e borda lateral da área 17 foi utilizado a objetiva de 2,5 x. Para ilustrar as varicosidades foi utilizado um microscópio binocular ligado a uma videocâmara e conectado a um computador. Esta captura de imagem foi realizada utilizando a objetiva de 100 x.

**Figura 02: Equipamento disponível no LAFINNT/UFPE (microscópio óptico e câmara clara acoplada à ocular; foto A) e no Laboratório de Neuroanatomia Funcional/UFPA (microscópio, câmara clara, computador e “nobra”; foto B), utilizados respectivamente para a reconstrução bidimensional (desenho das células em papel) e para reconstrução tridimensional das células (com auxílio do computador).**



## 7. Análises estatísticas

Os valores obtidos em cada neurônio foram calculados pelo programa “Neuroexplorer”. Esses valores foram organizados em planilha do programa “Excel” e a densidade de varicosidades foi calculada, dividindo-se o número total de varicosidade pelo comprimento dendrítico. Em seguida, as análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa de computador Bioestat, versão 2.0 e 3.0 (Ayres e col., 2003). Para as comparações inter-grupos, os dados foram submetidos à ANOVA e posteriormente ao teste de Newman-Keuls e ao Teste de Tukey. As diferenças de orientação dos dendritos (vertical *versus* horizontal), de cada célula estudada em um mesmo grupo, foram analisadas pelo teste *t* pareado (comparações intra-grupo). Foram consideradas significativas aquelas diferenças em que  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1- Peso corporal

A tabela 06, que se refere à evolução ponderal dos animais, indica que os filhotes dos grupos N12 ganharam, em média, menos peso que seus respectivos controles até os 25 dias, enquanto estavam sendo amamentados. Houve diferenças significativas entre os grupos Água, L-Arginina e Ingênuo criados em grandes ninhadas e seus respectivos controles nutricionais (grupos N6) nos 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dias de vida.

Após o período de amamentação, alimentando-se com a dieta Labina, não houve mais diferenças significativas entre os grupos, incluindo neste caso também o HIST-N6. Foi observado que este grupo não diferiu significativamente dos demais grupos nutridos em nenhuma das datas de pesagem.

### 2- Peso encefálico

Os valores apresentados na tabela 07 se referem ao peso encefálico após perfusão. Os grupos N12 (Ingênuo e L-Arginina) possuíram encéfalos significativamente mais leves que seus respectivos controles N6. Isto não ocorreu no que diz respeito aos dois grupos tratados com água. Neste caso não houve diferença significativa entre a condição N6 e a N12, apesar do grupo N6 ter o encéfalo, em média, mais pesado.

Também chama a atenção, na condição N6, a diferença significativa entre os grupos tratados com L-Arginina e L-Histidina, tendo este último grupo encéfalos menos pesados que o primeiro.

### **3 – Análises Quantitativas**

#### **3.1 – Análises bidimensionais**

Para localizar as células contendo NADPH-d, na área 17, nós levamos em consideração as características da laminação das camadas corticais, revelada pela histoquímica da NADPH-d na neurópila. As fotomicrografias dos limites lateral e medial da área 17 (figura 03) mostraram-se coincidentes com as descritas por Borba e col. (2000).

As células desenhadas no papel, com uso de microscópio e câmara clara, foram avaliadas (por meio dos desenhos) quanto à orientação dos seus ramos dendríticos, utilizando os “Círculos de Scholl”. Em todos os casos, as células desenhadas apresentaram valores (tabela 08) mais altos no sentido vertical, do que no horizontal ( $p < 0,01$ ), independente do tratamento recebido. Os grupos não diferiram significativamente entre si no que se refere à assimetria acima descrita. Isto torna-se visível nas fotomicrografias das células (figura 04).

Quanto ao número total de neurônios contados na substância cinzenta e em parte da substância branca, da área 17 do hemisfério esquerdo, os grupos mais uma vez não diferiram significativamente, após terem sido submetidos à Anova. O número de células apresentou-se semelhante, independente do tratamento a que os animais foram submetidos (tabela 08).

#### **3.2 – Análises tridimensionais**

##### **3.2.1 – Morfometria do corpo celular**

A análise tridimensional foi realizada nos quatro grupos fundamentais deste trabalho, ou seja: ARG-N6, ARG-N12, H<sub>2</sub>O-N6 e H<sub>2</sub>O-N12. As células desses grupos

foram digitalizadas e, por meio de programa de computador, foi possível analisar aspectos referentes ao soma dos neurônios e submeter os dados à análise estatística. A Anova indicou que não houve diferença significativa entre os grupos no que diz respeito à área e ao perímetro (tabela 09).

### **3.2.2 – Morfometria dos Dendritos**

Os mesmos quatro grupos analisados quanto ao soma foram submetidos à avaliação dos dendritos no que diz respeito à área, volume, pontos de bifurcação e dimensão fractal - DF (k-dim). Em nenhum desses aspectos houve diferenças significativas (tabela 09).

Quando analisamos os dendritos quanto à densidade de varicosidades (definida como sendo o número de varicosidades dividido pelo comprimento total do dendrito), pudemos observar diferenças significativas entre os grupos (figura 05). Aqueles que receberam L-Arginina apresentaram maiores densidades de varicosidades que seus controles que receberam água destilada (tabela 09).

Quanto à frequência de ramificação dendrítica (tabela 10), os grupos que receberam L-Arginina e seus controles, não apresentaram diferenças significativas no que diz respeito a dendritos de primeira e segunda ordem. Porém, os dendritos de terceira ordem foram significativamente em maior número no ARG-N12 quando comparados ao ARG-N6 e H<sub>2</sub>O-N12. Também nos dendritos de quarta ordem, o grupo ARG-N12 apresentou maior número que os controles que receberam água.

**Tabela 06: Evolução ponderal de ratos dos grupos H<sub>2</sub>O-N12 (■), H<sub>2</sub>O-N6 (●), ING-N6 (♠), ING-N12 (♣), ARG-N6 (♥), ARG-N12(♦) e HIST-N6 (▲) nos 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup>, 25<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 60<sup>o</sup> e 90<sup>o</sup> dias de vida. Os valores representam a média ± erro-padrão com o número de animais indicado entre parênteses. Os símbolos, com e sem asteriscos, indicam valores significativamente diferentes (respectivamente  $p \leq 0,05$  e  $p \leq 0,01$ ) dos respectivos valores dos grupos marcados com o mesmo símbolo na coluna da esquerda. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey.**

Grupos	Pesos corporais (g)						
	7 <sup>o</sup> dia	14 <sup>o</sup> dia	21 <sup>o</sup> dia	25 <sup>o</sup> dia	30 <sup>o</sup> dia	60 <sup>o</sup> dia	90 <sup>o</sup> dia
ING-N6 (♠)	16,01 ± 0,819 (10)	30,64 ± 1,344 (10)	48,18 ± 2,496 (10)	65,51 ± 3,445 (10)	89,26 ± 5,435 (10)	261,22 ± 8,330 (10)	339,45 ± 11,302 (10)
H <sub>2</sub> O-N6 (●)	18,90 ± 0,663 (♠) (8)	33,42 ± 1,013 (10)	50,46 ± 1,632 (10)	69,12 ± 2,181 (6)	89,51 ± 4,065 (10)	260,46 ± 7,706 (10)	368,49 ± 16,051 (10)
ARG-N6 (♥)	19,45 ± 0,585 (♠)* (8)	33,76 ± 1,185 (10)	52,34 ± 1,796 (10)	71,30 ± 2,522 (7)	92,79 ± 4,323 (10)	269,91 ± 8,943 (10)	371,63 ± 13,921 (10)
HIST-N6 (▲)	18,21 ± 0,577 (8)	32,49 ± 1,104 (8)	50,31 ± 1,927 (8)	66,56 ± 2,510 (8)	88,51 ± 2,947 (8)	245,96 ± 9,423 (8)	332,97 ± 11,383 (8)
ING-N12 (♣)	13,32 ± 0,457 (♠) (10)	22,26 ± 0,624 (♠)* (10)	36,22 ± 0,803 (♠)* (10)	52,95 ± 1,289 (♠)* (10)	77,66 ± 1,832 (10)	234,94 ± 7,135 (10)	310,88 ± 5,529 (10)
H <sub>2</sub> O-N12 (■)	13,54 ± 0,606 (●)* (10)	23,58 ± 0,893 (●)* (10)	38,29 ± 1,357 (●)* (10)	52,63 ± 1,410 (●)* (7)	77,59 ± 2,744 (10)	240,71 ± 5,766 (10)	332,04 ± 8,929 (10)
ARG-N12 (♦)	15,36 ± 0,711 (♥) (10)	25,91 ± 1,261(♥)* (10)	42,01 ± 2,174 (♥)* (10)	54,10 ± 1,792 (♥)* (6)	84,69 ± 3,973 (10)	258,76 ± 7,217 (10)	342,99 ± 9,275 (10)

**Tabela 07: Peso encefálico, após perfusão, dos grupos H<sub>2</sub>O-N12 (■), H<sub>2</sub>O-N6 (●), ING-N6 (♠), ING-N12 (♣), ARG-N6 (♥), ARG-N12(♦) e HIST-N6 (▲). Os valores representam a média ± erro-padrão com o número de animais indicado entre parênteses. Os símbolos indicam valores significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) dos respectivos valores dos grupos marcados com o mesmo símbolo na coluna da esquerda. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Newman Keuls.**

Grupos	Peso encefálico úmido após perfusão (g)
ING-N6 (♠)	1,6118 ± 0,0361 (10)
H <sub>2</sub> O-N6 (●)	1,6076 ± 0,0399 (10)
ARG-N6 (♥)	1,6603 ± 0,0226 (10)
HIST-N6 (▲)	1,5328 ± 0,0294 (♥) (8)
ING-N12 (♣)	1,5221 ± 0,0204 (♠) (10)
H <sub>2</sub> O-N12 (■)	1,5388 ± 0,0219 (10)
ARG-N12 (♦)	1,5602 ± 0,0427 (♥) (10)

**Tabela 08: Tendência de orientação, vertical ou horizontal, dos dendritos, bem como número de neurônios NADPH-d positivos na área 17 do hemisfério esquerdo, dos ratos dos sete grupos deste trabalho. A tendência de orientação foi quantificada por meio dos “Círculos de Scholl”. O número de neurônios foi avaliado por contagem direta de todas as células marcadas no hemisfério esquerdo, nos cortes contendo a área 17. Os valores representam a média  $\pm$  erro-padrão, com o número de medidas entre parênteses. A ANOVA indicou que as diferenças inter-grupos não são significantes. Os asteriscos indicam diferenças significantes de orientação (vertical > horizontal), nas comparações intra-grupo, após utilização do teste *t* pareado.**

Grupos (No. de ratos)	Nº de intersecções dos dendritos com os Círculos de Scholl		Número de neurônios/corte	
	Quadrantes		Subst. Cinzenta	Subst. Branca
	Verticais	Horizontais		
ING-N6 (♠) (5)	24,73 $\pm$ 1,89* (30)	14,90 $\pm$ 1,10 (30)	29,83 $\pm$ 0,61 (76)	4,03 $\pm$ 0,22 (76)
H <sub>2</sub> O-N6 (●) (5)	26,71 $\pm$ 2,05* (31)	14,00 $\pm$ 1,29 (31)	28,99 $\pm$ 0,77 (80)	3,69 $\pm$ 0,22 (80)
ARG-N6 (♥) (5)	28,61 $\pm$ 2,19* (33)	16,21 $\pm$ 1,64 (33)	30,22 $\pm$ 0,70 (77)	3,90 $\pm$ 0,22 (77)
HIST-N6 (▲) (5)	24,20 $\pm$ 2,24* (30)	13,67 $\pm$ 1,15 (30)	31,37 $\pm$ 0,78 (68)	3,69 $\pm$ 0,28 (68)
ING-N12 (♣) (5)	24,37 $\pm$ 2,34* (30)	16,40 $\pm$ 1,27 (30)	30,94 $\pm$ 0,70 (84)	3,92 $\pm$ 0,23 (84)
H <sub>2</sub> O-N12 (■) (5)	25,23 $\pm$ 1,69* (30)	14,13 $\pm$ 1,58 (30)	30,83 $\pm$ 0,81 (70)	4,25 $\pm$ 0,26 (65)
ARG-N12 (♦) (5)	28,55 $\pm$ 2,13* (33)	14,51 $\pm$ 1,33 (33)	31,93 $\pm$ 0,85 (67)	4,30 $\pm$ 0,27 (67)

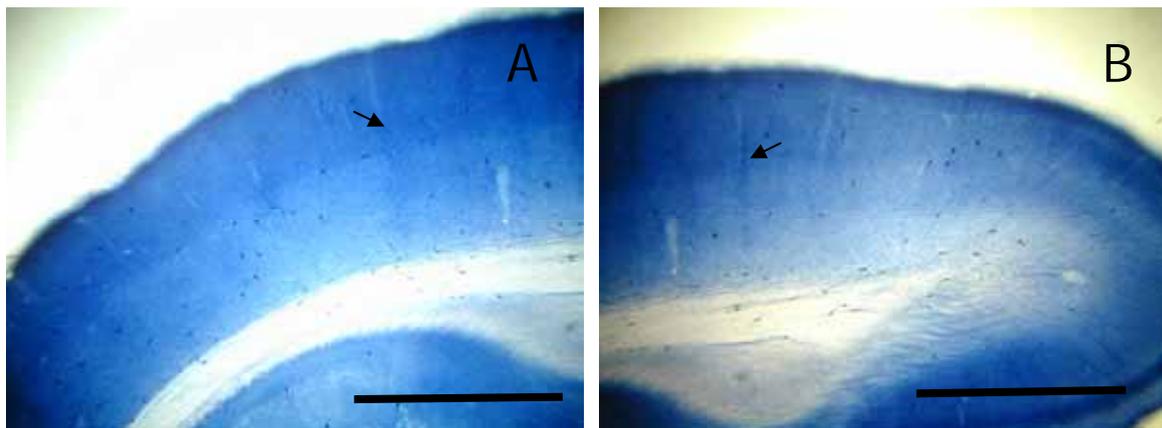
**Tabela 09: Análise da área e perímetro do soma; e área, volume, pontos de bifurcação, dimensão fractal (DF) e densidade de varicosidade (DV; número de varicosidade / comprimento total dendrítico) dos dendritos das células desenhadas dos grupos ARG-N6 (♥), ARG-N12(♦), H<sub>2</sub>O-N6 (●) e H<sub>2</sub>O-N12 (■). Os valores representam a média ± erro-padrão, com o número de medidas indicado entre parênteses. Os símbolos indicam valores significativamente diferentes ( $p \leq 0,01$ ) dos respectivos valores dos grupos marcados com o mesmo símbolo na coluna da esquerda. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Newman Keuls e teste de Tukey.**

Grupos	Análise do Soma		Análise dos Dendritos				
	Área	Perímetro	Área	Volume	PB	DF	DV
	( $\mu\text{m}^2$ )	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}^2$ )	( $\mu\text{m}^3$ )		(k-dim)	(n/ $\mu\text{m}$ )
H <sub>2</sub> O-N6 (●)	270,3084 ± 12,2137 (30)	71,0930 ± 2,6232 (30)	1672,661 ± 84,8071 (30)	86,6141 ± 4,3915 (30)	175,667 ± 0,7622 (30)	1,0511 ± 0,0036 (30)	18,484 ± 1,6265 (28)
ARG-N6 (♥)	284,6509 ± 12,6188 (30)	72,597 ± 2,5252 (30)	1845,599 ± 112,4265 (30)	95,5693 ± 5,8217 (30)	178,333 ± 0,8971 (30)	1,0561 ± 0,0045 (30)	28,884 ± 2,5278 (●) (25)
H <sub>2</sub> O-N12 (■)	244,6451 ± 9,7496 (30)	65,6500 ± 2,0439 (30)	1616,764 ± 88,9827 (30)	83,7197 ± 4,6077 (30)	174,667 ± 0,7393 (30)	1,0507 ± 0,0039 (30)	13,089 ± 1,5309 (25)
ARG-N12 (♦)	267,6231 ± 13,6332 (30)	67,600 ± 2,2376 (30)	1764,496 ± 89,4477 (30)	91,3696 ± 4,6318 (30)	183,667 ± 0,7184 (30)	1,0583 ± 0,0044 (30)	25,974 ± 2,6963 (■) (29)

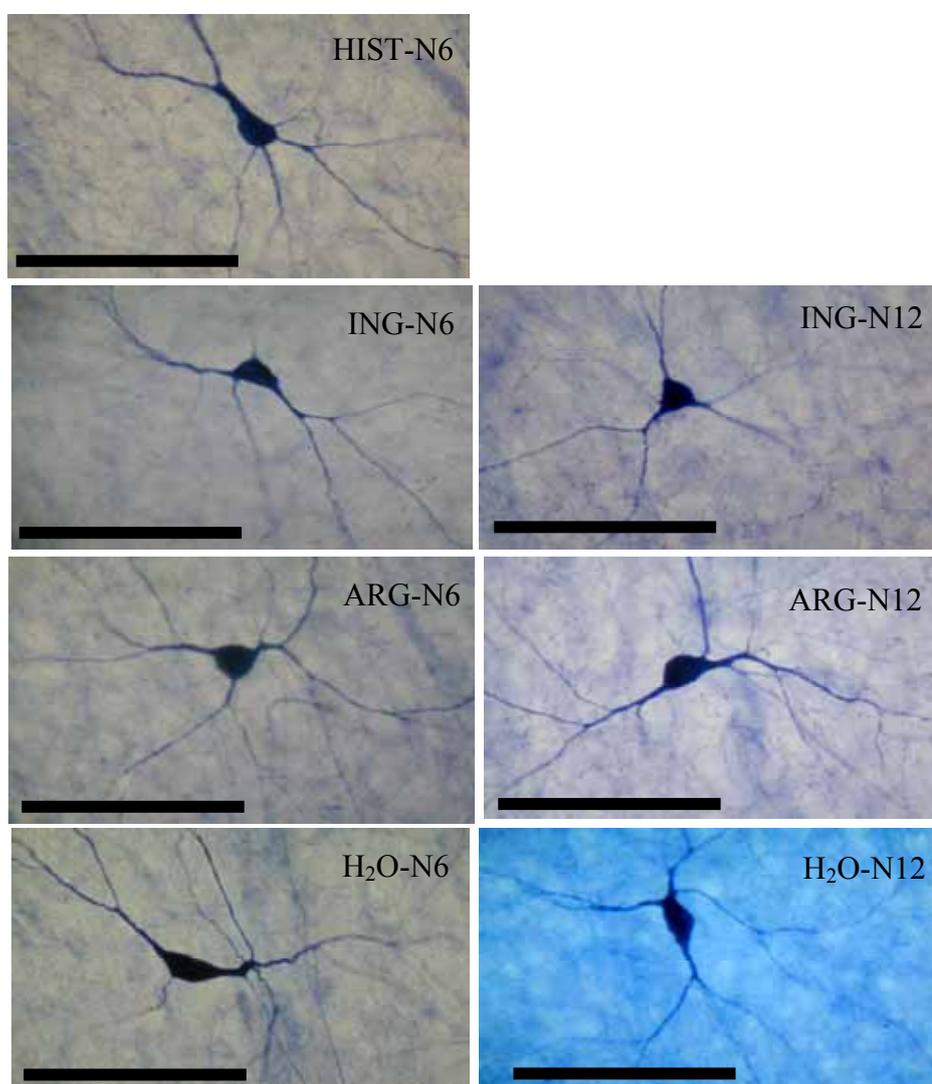
**Tabela 10: Frequência de ramificação dendrítica, de 1º, 2º, 3º e 4º ordens, dos grupos ARG-N6 (♥), ARG-N12(♦), H<sub>2</sub>O-N6 (●) e H<sub>2</sub>O-N12 (■). Os valores representam a média ± erro-padrão com o número de medidas indicado entre parênteses. Os símbolos com e sem asterisco indicam valores significativamente diferentes (respectivamente  $p \leq 0,05$  e  $p \leq 0,01$ ) dos respectivos valores dos grupos marcados com o mesmo símbolo na coluna da esquerda. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey.**

Grupos	Número de Ramos Dendríticos/Neurônio			
	Primário	Secundário	Terciário	Quaternário
H <sub>2</sub> O-N6 (●)	3,97 ± 0,2116 (30)	7,30 ± 0,3929 (30)	7,47 ± 0,3946 (30)	7,52 ± 0,4171 (29)
ARG-N6 (♥)	3,77 ± 0,1899 (30)	6,93 ± 0,3105 (30)	7,00 ± 0,4262 (30)	6,70 ± 0,4774 (30)
H <sub>2</sub> O-N12 (■)	3,83 ± 0,2202 (30)	6,97 ± 0,3571 (30)	7,03 ± 0,3269 (30)	6,17 ± 0,3716 (30)
ARG-N12 (♦)	3,77 ± 0,1899 (30)	7,30 ± 0,3749 (30)	9,14 ± 0,4170 (■)*(♥)* (28)	8,10 ± 0,5432(■) (30)

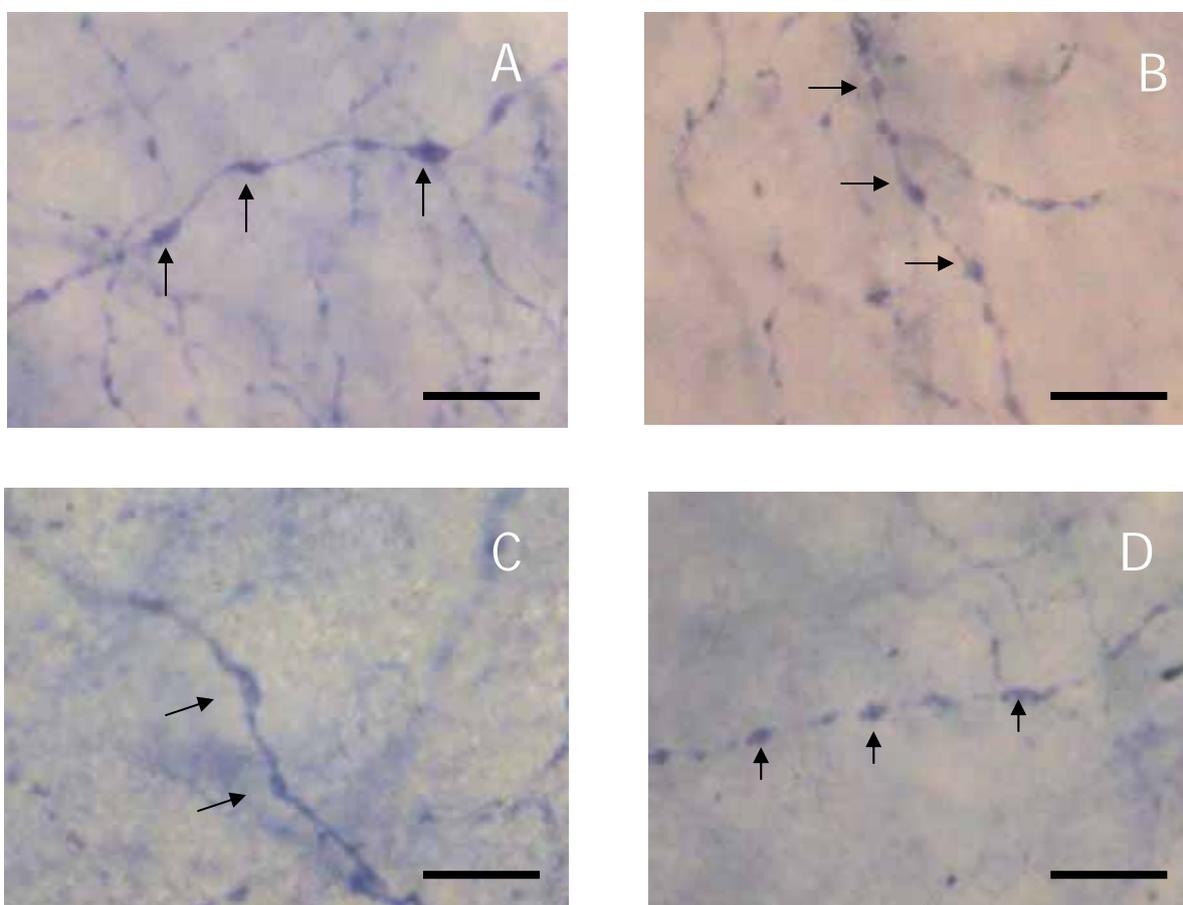
**Figura 03: Fotomicrografias, em pequeno aumento, de um corte coronal para ilustrar os limites lateral (seta em A) e medial (seta em B) da área 17, após a marcação histoquímica da NADPH-diaforase. O corte pertence a um animal adulto do grupo H<sub>2</sub>O-N12. Ambas as fotos foram retiradas com a objetiva de 2,5 x de aumento. Barra de escala: 1mm**



**Figura 04: Fotomicrografias em grande- aumento, de células NADPH-diaforase-positivas de ratos adultos que foram alimentados em ninhadas de 6 e 12 filhotes (respectivamente grupos N6 e N12) e tratados por gavagem, dos 7<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia de vida, com arginina (ARG), água (H<sub>2</sub>O), histidina (HIS), ou sem qualquer tratamento (grupo ingênuo; ING). Barra de escala de 100 μm.**



**Figura 05: Fotomicrografias em grande aumento para ilustrar varicosidades (setas) nos dendritos NADPH-diaforase positivos, na área 17 de ratos adultos que foram alimentados em ninhadas de 6 (A, C) e 12 (B, D) filhotes (respectivamente grupos N6 e N12) e tratados por gavagem, dos 7<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia de vida. As fotos A e B foram de animais tratados com L-Arginina e C e D foram tratados com água. Os ratos apresentavam idade de 90 (B, D), 96 (A), 117 (C) dias. Os dados quantitativos estão na Tabela 09. Barra de escala de 1  $\mu$ m.**



## DISCUSSÃO

É sabido que os aminoácidos têm papel importante para a manutenção dos tecidos. No entanto, a função de cada aminoácido específico precisa ser melhor estudada (Mahan e Escott-Stump, 1998).

Sabe-se que o suprimento alimentar e o metabolismo de ingredientes alimentares em mulheres, durante a lactação, e em seus bebês tem implicações a longo prazo para o desenvolvimento e saúde da criança (Koletzko e col., 1998). A alteração da ingestão de proteínas e aminoácidos pode modular a ação da maioria dos processos metabólicos (tais como síntese e degradação protéica e oxidação de aminoácidos) responsáveis pela manutenção do organismo, da proteína corporal total e homeostase dos aminoácidos (Young e Marchini, 1990). Tem-se conhecimento de que o requerimento de aminoácidos é elevado no aleitamento. Nesse período, o sistema digestório ainda se apresenta relativamente imaturo. Por essas razões, o lactente é mais dependente da ingestão de proteína e carboidratos dietéticos (Jessop, 1997). Ainda segundo esse autor, caso a ingestão de nutrientes e a sua conseqüente absorção, não sejam capazes de prover o suprimento necessário de aminoácidos, proteínas endógenas serão mobilizadas. A adição à dieta de 1 ou mais aminoácidos, em quantidades que individualmente não são tóxicas, pode provocar o desbalanço de aminoácidos (Gietzen, 1993; Gietzen e col., 1998). Esta adição de aminoácido parece causar modificações adaptativas em mecanismos neurais implicados em mudanças comportamentais (Gietzen, 1993; Gietzen e col., 1998). Esse desbalanço pode induzir deficiência aguda de aminoácidos, resposta hipofágica na maioria dos animais e atraso no crescimento (Gietzen, 1993; Gietzen e col., 1998). Sabendo disto, buscou-se, no presente trabalho, encontrar um outro aminoácido que fosse usado como controle da administração de L-Arginina, sendo

escolhida então a L-Histidina, pelas razões já explicitadas em “métodos”. Procurou-se, ao utilizar este controle, tornar mais claro o papel específico da L-Arginina em produzir os efeitos, que foram analisados morfometricamente, nos neurônios NADPH-d positivos na área 17.

As transformações metabólicas dos aminoácidos da dieta têm papel importante na sua utilização eficiente, tanto em animais quanto em humanos (Wu, 1998). Considerando, segundo esse mesmo autor, que ao desmame a degradação da Arginina intestinal é notadamente elevada, buscou-se fornecer tanto a L-Arginina quanto a L-Histidina até os 28 dias de vida dos animais, incluindo assim o período de lactação e mais três dias pós-desmame. A literatura refere que no trato digestivo a L-Arginina é rapidamente e quase completamente absorvida pela membrana da borda em escova intestinal, via transporte ativo (Böger e Bode-Böger, 2001). Com base nessas evidências, no presente trabalho, a administração da L-Arginina foi feita pela via mais natural (via oral), admitindo-se que a sua eficiente absorção elevaria a concentração sanguínea e conseqüentemente a sua oferta ao cérebro pela circulação. Com efeito, alterações opostas (redução da Arginina sérica e da excreção urinária de nitratos) foram descritas em ratos jovens tratados com dietas especiais carentes em L-Arginina (Wu e col., 1999). No presente trabalho, dosagens bioquímicas, que poderiam confirmar o aumento de Arginina na circulação sanguínea e no tecido cerebral, como conseqüência do tratamento, não puderam ser realizadas. Contudo, mesmo sem essa comprovação, tem-se evidência de que o tratamento com L-Arginina, por gavagem modifica parâmetros eletrofisiológicos, no rato. Por exemplo, Frazão (2004) utilizando o mesmo paradigma experimental deste trabalho, demonstrou que, na condição N6, o tratamento com L-Arginina aumentou a susceptibilidade cortical à depressão alastrante (DA; velocidades de propagação mais altas do que no grupo tratado com água). Esse efeito

achava-se abolido na condição N12. Ainda nesse trabalho, a autora demonstrou que o tratamento com L-Histidina (que não participa da síntese do óxido nítrico) não mimetizou o efeito da L-Arginina sobre a DA, sugerindo que tal efeito não seria uma modificação genérica, decorrente do aumento da quantidade de nitrogênio oferecida pelo aminoácido, mas sim seria específico da L-Arginina.

Além das razões acima, é desejável que estudos bioquímicos examinem futuramente o presente tema, tendo-se em vista evidências experimentais que sugerem inter-relações funcionais entre a L-Arginina e vários hormônios, que poderiam interferir no transporte e metabolismo desse aminoácido, e conseqüentemente na síntese do óxido nítrico (Sobrevia e col., 1996; Moncada e col., 1989).

O aminograma da dieta “Labina”, oferecida à mãe (e aos filhotes após o desmame), confirmou que essa dieta continha todos os aminoácidos necessários para uma lactogênese normal, o que seria a base para o desenvolvimento adequado dos filhotes, nas ninhadas de tamanho menor (grupo N6). Assim, embora não se tenha determinado a composição nutricional do leite das ratas nutrizas, é razoável supor que tal composição tenha se aproximado daquela descrita por Boxwell e col., (1995) como sendo a composição normal.

Em muitas regiões cerebrais, a maioria dos aminoácidos parece ser surpreendentemente estável durante todo o ciclo estral da rata, embora mudanças muito específicas em algumas regiões cerebrais, que incluem diminuições dos níveis hipotalâmicos de GABA e glutamato durante o proestro, tenham sido sugeridas (Löscher e col., 1992). A decisão de, neste trabalho, só utilizar machos para avaliar os efeitos neuro-histológicos da administração da L-Arginina teve como finalidade evitar interferências nos parâmetros morfométricos estudados, associadas ao ciclo estral das ratas.

É importante dizer que a administração de aminoácidos por gavagem não acarretou elevação da mortalidade dos filhotes, mesmo entre os desnutridos. Os poucos casos de óbito de filhotes foram devidos a acidente no procedimento de introdução da cânula de gavagem, quando a solução injetada atingiu indevidamente os pulmões. A baixa mortalidade permite destacar, por um lado, que essa técnica é segura, sendo de fácil treinamento e aplicação, e por outro lado, permite inferir que as doses dos aminoácidos empregadas neste trabalho foram desprovidas de toxicidade significativa.

Os presentes dados indicam que o tipo de desnutrição por aumento do tamanho da ninhada foi eficiente em reduzir os pesos corporal e encefálico dos filhotes. De fato, parece que a quantidade de leite fornecida pela mãe aos filhotes do grupo N12 não supriu totalmente a necessidade dos mesmos, levando à desnutrição. Esta persistiu enquanto durou o aleitamento (a julgar pela redução significativa do peso corporal dos grupos N12, quando comparados aos seus respectivos controles N6), corroborando trabalhos anteriores que usaram este modelo experimental (Pontes Filho, 2003; Rocha-de-Melo, 2001). Porém, torna-se importante notar que, passado o desmame, os animais conseguiram recuperar o ganho de peso corporal normal deixando de haver diferenças significativas entre os grupos. Ou seja, segundo o parâmetro de peso corporal há uma aparente recuperação da condição de desnutrição dos animais, após o aleitamento.

Tal recuperação não aconteceu com relação ao peso encefálico, avaliado quando os filhotes se tornaram adultos. Como visto nos resultados, o grupo N12 apresentou peso encefálico reduzido quando comparado aos seus controles bem alimentados (grupo N6). Isto pode indicar alterações estruturais duradouras do sistema nervoso central, decorrentes da desnutrição precoce. Rocha-de-Melo (2001) já havia demonstrado que animais N12 sacrificados aos 90 dias apresentavam redução de peso encefálico quando comparados com animais criados em ninhadas compostas de 6

filhotes. Esse mesmo trabalho refere ainda que aos 30 dias tal diferença já ocorria, o que nos faz concluir que o impacto da desnutrição sobre o peso do encéfalo se instala no início da vida e se torna permanente, independente da recuperação do peso corporal. É, pois, oportuno reforçar aqui o alerta que o LAFINNT vem divulgando incessantemente: “embora a determinação do peso corporal seja um procedimento útil e necessário para a avaliação do estado nutricional geral do organismo, ele não é suficiente para avaliar desenvolvimento e funções cerebrais”.

Neste trabalho, a redução do peso encefálico pode ter ocorrido devido a uma diminuição da quantidade de mielina, bem como do número e tamanho de vários tipos celulares do sistema nervoso (Morgane e col., 1993). É razoável admitir que ao menos alguns dos processos que levam à maturação neuronal estariam alterados, fazendo com que houvesse mudanças no desenvolvimento das ramificações dendríticas e contatos sinápticos (Borba e col., 2000; Morgane e col., 1992, Picanço-Diniz e col., 1998; Rocha-de-Melo, 2001).

Estimativas bioquímicas em homogenatos têm sugerido que a desnutrição no início da vida causaria déficits permanentes no número de células. Recentemente, tal sugestão foi analisada e questionada por Bedi (2003). Esse autor argumenta que, em tal condição metodológica (dosagens bioquímicas em homogenatos), variações no número total de células podem refletir alterações em neurônios, em células gliais ou na combinação desses tipos celulares (Bedi, 2003). As críticas desse autor englobam também trabalhos que referem contagem do número de neurônios por campo do microscópio ou por unidade de área da sessão histológica ou ainda por unidade de volume do tecido, ou seja, *densidade numérica*. Em ratos desnutridos, ocorre um aumento na densidade de células NADPH-d positivas, tanto na substância cinzenta quanto na branca, quando comparados aos controles bem alimentados (Borba e col.,

2000; Picanço-Diniz e col., 1998; Rocha-de-Melo, 2001). Isto provavelmente ocorre por causa do fenômeno chamado empacotamento celular (“cell packing”) que acontece no córtex cerebral, quando submetido à desnutrição severa precocemente. Caracteriza-se por um agrupamento quantitativamente excessivo de células por unidade de área ou volume. Isso acontece porque, devido à desnutrição, as células reduzem-se de tamanho e também ocorre redução no conteúdo da mielina do cérebro (Levitsky e Strupp, 1995). Atualmente tem-se recomendado que, sempre que possível, se realize a contagem de células em termos do número total ao invés da densidade numérica (Bedi, 2003). Isto porque dados usando a densidade numérica parecem ser limitados e difíceis de interpretar, principalmente para o cérebro em desenvolvimento (Bedi, 2003).

A metodologia usada neste experimento forneceu resultados que reforçam a idéia de que a quantidade total de células NADPH-d positivas é mantida, em condições nutricionais adversas. Esses resultados são coerentes com a idéia defendida por Bedi (2003) de que o número total de alguns tipos de neurônios corticais poderia ser geneticamente controlado, sendo, portanto uma variável difícil de se modificar, mesmo na vigência de desnutrição no início da vida.

Um aspecto notável dos neurônios que contêm a enzima NADPH-d é sua resistência seletiva, frente a condições clínicas com reconhecido potencial neurodegenerativo, como por exemplo a doença de Huntington. Nesta condição, mais de 95% dos neurônios NADPH-d sobrevivem (Bredt e Snyder, 1992). Do mesmo modo, o tratamento com NMDA destrói 90% ou mais de neurônios de culturas do córtex cerebral primário, mas os neurônios NADPH-d sobrevivem nessas culturas (Bredt e Snyder, 1992). Esses autores levantam a possibilidade de que a atividade da SON, que origina a coloração NADPH-d, poderia ser a responsável por esta resistência (Bredt e Snyder, 1992). Coerente com essa idéia, estudos em camundongos transgênicos com

mutação para a doença de Huntington demonstraram alterações na atividade da SON, dependentes da idade dos animais, e que seriam moduladas pelo teor de L-Arginina oferecida na dieta (Deckel e col., 2000; Pérez-Severiano e col., 2002). Este último aspecto (uso terapêutico da Arginina dietética em certas doenças) será analisado mais adiante.

No que diz respeito às células analisadas neste trabalho, procurou-se contemplar, na amostra estudada, tanto as células das camadas supra-granulares quanto as das camadas infra-granulares, em proporções aproximadamente iguais, de modo que os grupos pudessem ser comparáveis. Com relação à área e ao perímetro do soma, bem como à área, volume, pontos de bifurcação e dimensão fractal dendríticas, foram obtidos resultados semelhantes entre os grupos. Isto reforça a idéia da resistência destes neurônios a manipulações nutricionais como aquelas usadas neste trabalho (desnutrição e administração excessiva de L-Arginina).

Com relação aos efeitos da desnutrição, os dados referentes à área e ao perímetro do soma coincidiram com aqueles de Borba e col. (2000), na idade adulta. No entanto, aos 30 dias, esses autores demonstraram diferenças, nos referidos parâmetros, associadas à desnutrição. Sendo assim, alterações no soma atribuídas à desnutrição precoce tenderiam a ser transitórias. Rocha-de-Melo (2001) reforçou esta hipótese quando encontrou em animais com 30 dias alteração no corpo celular.

A área dendrítica dos grupos N12 apresentou-se semelhante à dos seus controles (N6). Esse resultado contrasta com o de Borba e col. (2000). Esses autores descreveram um “efeito rebote”, representado por um aumento significativo da área dendrítica do grupo adulto precocemente desnutrido pela “Dieta Básica Regional” (DBR), a qual induz uma desnutrição quantitativa- e qualitativamente mais grave do que aquela do presente trabalho. A comparação desses resultados sugere que o efeito observado

depararia do tipo e da intensidade da desnutrição estudada. Esse ponto merece ser mais bem investigado no futuro.

Há, na literatura, informações de que apenas a desnutrição seria insuficiente para modificar o número de dendritos por células NADPH-d positivas (Borba e col., 2000; Picanço-Diniz e col., 1998), o que foi confirmado neste experimento (grupo H<sub>2</sub>O-N12). No entanto, a administração de L-Arginina no aleitamento esteve associada ao aumento no número de varicosidades (em ambas as condições nutricionais: N6 e N12; tabela 9) e de ramos dendríticos (na condição N12; tabela 10), na idade adulta. Estes resultados sugerem um efeito duradouro associado à L-Arginina. Resta esclarecer se o grau deste efeito seria influenciado diretamente pelo aminoácido ou se resultaria do agravamento do estado nutricional (principalmente no grupo N12), secundário ao tratamento com L-Arginina.

A dimensão fractal do contorno neuronal tem sido descrita como uma forma quantitativa de expressar o grau de complexidade celular, em termos de conectividade sináptica. Esta seria tanto maior quanto mais elevado fosse o valor numérico da dimensão fractal do neurônio em estudo (Fernández e Jelinek, 2001; Smith Jr. e col., 1989; Soltys e col., 2003). No presente experimento, os grupos apresentaram valores comparáveis de dimensão fractal, o que seria compatível com a idéia de resistência dos neurônios NADPH-d positivos a fatores “neuro-agressores”. Do mesmo modo, pode-se pensar que a falta de diferenças intergrupos quanto à orientação dos ramos dendríticos (avaliada, no presente trabalho, pelos Círculos de Scholl) suportaria também a hipótese da resistência neuronal a agressões.

É sabido que várias espécies de mamíferos têm características semelhantes quanto à distribuição tangencial de neurônios corticais NADPH-d positivos tipo I, apesar de não apresentarem a mesma distribuição laminar (Franca e col., 2000). Isto

leva a pensar que as presentes observações, em ratos, podem ter relevância em outras espécies, incluindo-se, talvez, a espécie humana. A gliogênese e a sinaptogênese são processos de desenvolvimento que estão ocorrendo em parte concomitantemente e em parte imediatamente após a neurogênese e a migração neuronal (Bedi, 2003). Como já mencionado na introdução, alterações nesses processos, causadas pela desnutrição, podem afetar o funcionamento cerebral (Bedi, 2003). Nessa situação (desnutrição), estudos histológicos indicam a presença de alterações no padrão de ramificação dos prolongamentos celulares e nas sinapses (Morgane e col., 1993), bem como na atividade de neurotransmissores cerebrais (Levitsky e Strupp, 1995; Wiggins e col., 1984). Convém lembrar que a significância funcional de alterações ao nível sináptico pode ser bem mais importante para o organismo do que mudanças, por exemplo, no número total de células (Bedi, 2003). Nesse sentido, as diferenças nas densidades de varicosidades, presentemente descritas, podem representar um efeito funcionalmente relevante do tratamento precoce com a L-Arginina.

A L-Arginina aumentou a densidade de varicosidades, em ambos os estados nutricionais. Esse incremento de potenciais sítios sinápticos, detectados na idade adulta, pode significar neuroplasticidade, em resposta à administração daquele aminoácido. A neuroplasticidade pode ser definida como a capacidade de modificação do tecido neural, frente a diversas alterações do seu ambiente, dentre as quais aquelas representadas por desequilíbrios nutricionais (Lent, 2001). Igualmente, algumas reações cerebrais conseqüentes a lesões traumáticas ou a processos estimuladores do aprendizado e da memória são consideradas com características de plasticidade (Lent, 2001; Renner e Rosenzweig, 1987). A neuroplasticidade varia de acordo com a idade do indivíduo sendo que durante o período crítico, o sistema nervoso torna-se mais suscetível a transformações causadas pelo ambiente externo (Lent, 2001). No caso dos neurônios

NADPH-d positivos, há evidências, no neocórtex e no hipocampo de roedores, de processos indicando plasticidade, processos estes que seriam modulados pela idade (Mollace e col., 1995; Pereira Jr e col., 2000; Zhang e col., 2002). Contudo, como os mecanismos celulares que levam à plasticidade ainda não são completamente conhecidos, é difícil afirmar com certeza, no caso do sistema nervoso, se modificações plásticas seriam sempre funcionalmente benéficas.

Também na epilepsia o ON tem papel dependente da idade, visto que no cérebro imaturo, os sistemas que regulam a atividade da crise epiléptica e suas conseqüências parecem ser altamente dependentes do ON (Vasconcelos e col., 1998). Além disto, as funções de certas áreas corticais parecem ser mais dependentes da produção intracortical do ON que outras, e um dano cortical pode causar citotoxicidade mais severa nas áreas com maior número de neurônios nSON- positivos (Bidmon e col., 1997). Tais achados podem contribuir para a compreensão de desordens cerebrais em pessoas idosas.

O tratamento de camundongos jovens transgênicos (mutação para a doença de Huntington) com dietas contendo 0%, 1,2% e 5% de L-Arginina indicou que esse aminoácido pode ter um efeito benéfico, retardando a progressão da doença, quando presente na dieta em dose adequada (1.2%), mas a sua ausência (0%) ou excesso (5%) seriam prejudiciais (Deckel e col., 2000). Esse resultado sugere que pacientes com aquela patologia seriam beneficiados com o consumo de L-Arginina, desde que em proporção adequada.

Em humanos, foi visto que neurônios NADPH-d positivos são relativamente escassos na formação hipocampal e que o padrão de coloração NADPH-d na neurópila nesta área também muda dramaticamente em pacientes com doença de Alzheimer (Rebeck e col., 1993). Esses autores sugerem que o ON teria implicações na

potenciação a longo-prazo, e mudanças na expressão da NADPH-d podem refletir perda de sinapses importantes para a formação da memória.

Algumas evidências mostram, por um lado, que o excesso de formação de ON pode induzir neurotoxicidade. Por outro lado, há também evidências de efeito neuroprotetor do ON em vários experimentos (ver a discussão de Pérez-Severiano e col., 2002). É possível então supor que o ON poderia ter ou efeitos deletérios, ou benéficos a depender, ao que parece, de fatores críticos como a delicadeza do balanço entre a reação de cada indivíduo, entre as espécies estudadas, e a metodologia utilizada no estudo. Cherian e col., (2003) examinaram qual seria a dose ótima e a janela temporal necessária para o efeito neuroprotetor da infusão da L-Arginina, em ratos, no sentido de aumentar o fluxo sanguíneo cerebral e reduzir danos neurológicos depois de traumatismo experimental cerebral. Esses autores encontraram um efeito benéfico com relação ao fluxo sanguíneo cerebral no local do dano, sendo a dose de 300mg/Kg a que produziu melhor efeito neuroprotetor. Eles demonstraram também que esse efeito é tempo-dependente, sendo os melhores resultados obtidos com administração logo após o dano (Cherian e col., 2003). Esses pesquisadores relataram ainda a ausência de efeitos adversos (como: hipotensão ou aumento da pressão intracraniana) atribuíveis à administração desse aminoácido. Em consonância com esses achados, a observação dos animais do presente trabalho indicou ausência de sinais reveladores de efeitos indesejáveis, como vômitos ou diarreia, em consequência da administração de L-Arginina. É interessante observar que DeWitt e col., (1997) usaram a forma D-Arginina e não encontraram efeito sobre o fluxo sanguíneo cerebral pós-traumático e nem sobre a concentração do óxido nítrico no cérebro. Baseado na possibilidade da L-Arginina ter um papel protetor neural, além do fato da grande resistência das células NADPH-d, já referida, admite-se que pode haver um benefício na suplementação desse aminoácido

para o sistema nervoso quando em presença de algumas patologias. Seria fundamental então encontrar doses e formas de administração adequada.

Há evidências de que, além do sistema nervoso, também o sistema cardiovascular (Böger e Bode-Böger, 2001) e o sistema imunológico (Nieves Jr. e LangKamp-Henken, 2002), poderiam ser beneficiados com o emprego terapêutico da L-Arginina. Nesses casos, muitos efeitos inconsistentes são devidos a numerosos fatores, tal como quantidade e período de administração da suplementação de Arginina, a espécie animal ou linhagem da espécie, e o modelo experimental utilizado.

O tratamento com L-Arginina+L-Lisina tem sido também associado a efeitos comportamentais benéficos (redução de ansiedade), em ratos estressados (Smriga e Torii, 2003). Na hipótese de poder ser extrapolado para a espécie humana, esse dado poderia ter importância clínica, em vista de relatos de que crianças desnutridas tendem a ser mais ansiosas e menos ativas (Barret e Radke-Yarrow, 1985; Meeks-Gardner e Grantham-McGregor, 1994). Nesse contexto, é interessante mencionar que a observação diária dos animais deste trabalho sugeriu (embora não se tenha quantificado) que o grupo N6 tratado com L-Arginina teria um padrão comportamental compatível com um menor nível de estresse (a julgar pela menor resistência ao se introduzir a sonda orogástrica), em comparação com os seus controles, tratados com água. A ingestão excessiva de L-Arginina poderia resultar no aumento dos níveis de amônia circulantes que poderiam ter repercussões a nível comportamental (Jones e Basile, 1998). Assim, considera-se interessante desenvolver futuros experimentos em que se possa correlacionar o tratamento com L-Arginina e variáveis comportamentais, como as acima referidas, ou outras relacionadas à aprendizagem e à memória.

As numerosas informações acumuladas até agora sobre o papel desempenhado pelo óxido nítrico no sistema nervoso, sugerindo ora neurodegeneração e ora

neuroproteção, devem estimular a investigação sobre o emprego do seu precursor, a L-Arginina. Estudos referentes às doses, aos períodos e às vias de sua administração reforçarão a importância do tema para a espécie humana. Pesquisas sobre a cinética da utilização deste aminoácido no organismo podem realmente levar a possíveis indicações terapêuticas em processos neurodegenerativos.

O que foi aqui discutido ressalta a importância de estudos visando conhecer melhor o papel funcional de certos nutrientes, bem como sua ação na prevenção e tratamento de neuropatologias. Esse tema vem crescendo em importância, em paralelo ao aumento da população de idosos em todo o mundo. Esse cenário implica na necessidade de atender a demanda de uma gama crescente de patologias vinculadas a essa faixa etária. Muitas dessas patologias envolvem o sistema nervoso.

Os presentes dados parecem ser de grande interesse para estudos de plasticidade sináptica durante o desenvolvimento e seu relacionamento com agentes agressivos como a desnutrição.

## CONCLUSÕES

- A manipulação do tamanho da ninhada afetou a evolução ponderal corporal durante o aleitamento, mas não no período pós-demame.
- A desnutrição foi capaz de reduzir o peso encefálico dos animais adultos na condição N12.
- Os resultados reforçam a idéia de que as células NADPH-d, à semelhança do que ocorre com outras condições agressoras, são resistentes à agressão nutricional.
- O tratamento com L-Arginina esteve associado ao aumento da densidade de varicosidades, independente do estado nutricional.
- Em animais mal-nutridos, a L-Arginina induziu também um aumento na frequência de ramificação dendríticas terciárias e quaternárias, os quais podem representar mecanismos de plasticidade adicionais ao aumento no número de varicosidades.

## PERSPECTIVAS

Para dar continuidade ao estudo desse tema, os presentes resultados, em animais adultos, permitem sugerir as seguintes perspectivas:

- - Investigar a possibilidade de efeitos semelhantes aos aqui descritos em condições bastante favoráveis de aleitamento ( ninhadas muito reduzidas);
- - Verificar o efeito da L-Arginina sobre o cérebro, a curto prazo (em animais recém-desmamados) ;
- - Estudar os efeitos de outras doses de L-Arginina (curva “dose/resposta”), para a determinação das doses mínima e máxima capazes de induzir um aumento no número de varicosidades;
- - Investigar os efeitos da L-Arginina usando outras vias de administração;
- - Avaliar comportamentos associados a ansiedade, estresse, aprendizagem e memória, correlacionando-os com o tratamento com L-Arginina;
- - Estudar comparativamente vários modelos de desnutrição, quanto aos efeitos neurais da L-Arginina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, M. S. **Análise qualitativa e quantidade de neurônios NADPH-diaforase positivos no córtex visual do rato adulto após desnutrição perinatal.** 1998. 58p. Tese (Mestrado em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ATOJI, Y.; YAMAMOTO, Y.; SUZUKI, Y. Distribution of NADPH diaphorase-containing neurons in the pigeon central nervous system **Journal of Chemical Neuroanatomy** n.2, p.11-22, 2001.

AYRES, M.; AYRES, J.R., M; AYRES, D.N.; SANTOS, A. S. **BioEstat 3,0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília: CNPQ, 2003, 290p.

BARRET, D. E.; RADKE-YARROW, M. Effects of nutritional supplementation on children's responses to novel, frustrating and competitive situations **American Journal Clinical Nutrition** n. 42, p.102-120, 1985.

BARRETO, M. L.; CARMO, E. H. Situação de Saúde da População Brasileira: tendências históricas, determinantes e implicações para as políticas de saúde. **Informe Epidemiológico do SUS**, p. 7-23, jul a dez 1994.

BATISTA FILHO, M. Alimentação, nutrição & saúde. In: **Epidemiologia & Saúde.** 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. cap.15, p.353-374.

BEAR, M. F.; CONNAS, B. W.; PARADISO, M. A. O sistema visual central. In: **Neurociências: Desvendando o sistema nervoso** 2a ed., Porto Alegre: Artmed, 2002. cap 10, 855p.

BEDI, K.S. Nutritional Effects on Neuron Numbers **Nutritional Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 141-152, jun. 2003.

BIDMON, H. J.; WU, J.; GÖDECKE, A.; SCHLEICHER, A.; MAYER, B.; ZILLES, K. Nitric oxide synthase-expressing neurons are area-specifically distributed within the cerebral cortex of the rat. **Neuroscience**, v. 81, n. 2, p. 321-330, 1997.

BÖGER, R. H.; BODE-BÖGER, S. M. The Clinical Pharmacology of L-Arginine **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 41, p.79-99, 2001.

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

BOXWELL, J.; AYSON, P.; RAMENOFKY, M. Growth and Metabolic Parameters in Pups of Undernourished lactating Rats. **Physiology & Behavior**, v. 57, n. 3, p. 469-475, 1995.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal Messenger. **Neuron**, v. 8, p. 3-11, Jan. 1992.

CHERIAN, L.; CHACKO, G.; GOODMAN, C.; ROBERTSON, C. S. Neuroprotective Effects of L-Arginine Administration after cortical Impact Injury in Rats: Dose Response and time window. **The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics**, v. 304, n. 2 304, p. 617-623, 2003.

COSTA-CRUZ, R. R. G.; GUEDES, R. C. A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v.303, p. 177-180, 2001.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Nitric oxide synthase: Role as a transmitter/Mediator in the Brain and Endocrine System. **Rev. Méd.**, v. 47, p. 219-27, 1996.

DE LUCA, B.; CIOFFI, A.; BURÉS, F. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. **Activ. Nerv Sup.**, v.19, n. 2, p. 130-131, 1977.

DECKEL, A. W.; VOLMER, P.; WEINER, R.; GARY, K. A.; COVAULT, J.; SASSO, D.; SCHMERLER, N.; WATTS, D.; YAN, Z.; ABELES, I. Dietary arginine alters time of symptom onset in Huntington`s disease transgenic mice. **Brain Research**, v. 875, p. 187-195, 2000.

DEVADAS, M.; LIU, Z.; KANEDA, M.; ARAI, K.; MATSUKAWA, T.; KATO, S. Changes in NADPH-diaphorase expression in the fish visual system during optic nerve regeneration and retinal development. **Neuroscience Research**, v. 40, p. 359-365, 2001.

DeWITT, D.S.; SMITH, T.G.; DEYO, D.J.; MILLER, K.R.; UCHIDA, T.; PROUGH, D.S. L-Arginine and superoxide dismutase prevent or reverse cerebral hypoperfusion after fluid-percussion traumatic brain injury. **J. Neurotrauma**. v.14, p.223-233, 1997.

DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain. **Amer. J. Dis. Child**, v.120, p. 411-415, 1970.

DOBBING, J.; SMART, J. L. Vulnerability of Developing Brain and Behaviour. **British Medical Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 164-168, 1974.

DOBBING; J.; SANDS, J. Cell size and cell number in tissue growth and development an old hypothesis reconsidered. **Arch Fr Pediath**, v. 42, p. 199-203, 1985.

FERNÁNDEZ, E.; JELINEK, H. F. Use of Fractal Theory in Neuroscience: Methods, Advantages, and Potencial Problems. **Methods** v. 24, p. 309-321, 2001.

FORBES, W. B., TRACY, C., RESNICK, O., MORGANE, P. J. Effects of maternal dietary protein restriction on growth of the brain and body in the rat. **Brain Research Bulletin**, v.2, p. 131-135, 1977.

FRANCA, J. G.; DO-NASCIMENTO, J. L. M.; PICANÇO-DINIZ, C. W.; QUARESMA, J. A. S.; SILVA, A. L. C. NADPH-diaphorase activity in área 17 of the squirrel monkey visual cortex: neuropil pattern, cell morphology and laminar distribution. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 1093-1105, 1997.

FRANCA, J.; VOLCHAN, E.; JAIN, N.; CATANIA, K. C.; OLIVEIRA, R. L. S.; HESS, F. L.; JABLONKA, M.; ROCHA-MIRANDA, C. E.; KAAS, J. H. Distribution of NADPH- diaphorase cells in visual and somatosensory córtex in four mammalian species. **Brain Research**, v. 864, p. 163-175, 2000.

FRAZÃO, M. F. **Depressão Alastrante Cortical em Ratos Adultos Tratados com L-Arginina Durante o Aleitamento** 2004 79p. Tese (Mestrado em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

FRIEDLANDER, M.J., LIN, C.S., STANFORD, L.R ;SHERMAN,S.M. Morphology of functionally identified neurons in lateral geniculate nucleus of the cat. **Journal of Neurophysiology**, v. 46, p.80-129, 1981.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing fator release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v.336, p. 385-88, 1988.

GIETZEN, D. W. Neural Mechanisms in the Responses to Amino Acid Deficiency. **The Journal of Nutrition**, v. 123, p. 610-625, 1993.

GIETZEN, D. W.; ERECIUS, L. F.; ROGERS, Q. R. Neurochemical Changes after Imbalanced Diets Suggest a Brain Circuit Mediating Anorectic Responses to Amino Acid Deficiency in Rats. **Journal Nutrition**, v.128, p. 771-781, 1998.

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

GUEDES, R. C. A.; TEODÓSIO, N. R. O cérebro e a fome Funções cerebrais prejudicadas com a desnutrição. **Ciência Hoje**, v. 16, n. 94, p. 77-78, set./out. 1993.

GUEDES, R.C.A. O Cérebro desnutrido. **Ciência Hoje**, v. 3, n. 18, p.61-65, 1985.

HACK, M.; BRESLAU, N.; WEISSMAN, B.; ARAM, D.; KLEIN, N.; BORAWSKI, E. Effect of very Birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 225, p. 321-237, Jul. 1991.

JESSOP, N. S. Protein metabolism during lactation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 56, p. 169-175, 1997.

JONES, E. A.; BASILE, A. S. Does Ammonia Contribute to Increased GABA-ergic Neurotransmission in Liver Failure? **Metabolic Brain Disease**, v. 13, n. 4, p. 351-360, 1998.

KOLETZKO, B.; AGGETT, P.J.; BINDELS, J.G.; BUNG, P.; FERRÉ, P.; GIL, A.; LENTZE, M.J.; ROBERFROID, M.; STROBEL, S. Growth, desenvolvimento and differentiation: a functional food science approach. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. 1, p. S5-S45, 1998. Suplemento.

LEIGH, P.N., CONNICK, J.H., STONET, T.W. Distribution of NADPH-diaphorase positive cells in the rat brain. **Com Biochem. Physiol.**, v. 97, n. 2, p. 259-264, 1990.

LENT, R. Bases Biológicas da Neuroplasticidade. In: **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001. cap. 5, p. 133-165.

LEVITSKY, D. A.; STRUPP, B. J. Malnutrition and the Brain: Changing Concepts, Changing Concerns. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2212S-2220S, 1995.

LÖSCHER, W.; WAHNCHAFTE, U.; RUNDFELDT, C.; HÖNACK, D.; HOPPEN, H. Regional Alterations in Brain Amino Acids During the Estrous Cycle of the Rat. **Neurochemical Research**, v. 17, n. 10, p. 973-977, 1992.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. Proteínas. In: **Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia**. 9ed. São Paulo: Roca, 1998, cap. 5, p. 63-76.

MARLETTA, M. A.; SPIERING, M. M. Trace Elements and Nitric Oxide Function. **Journal Nutrition**, v.133, p. 1431S-1433S, 2003.

MEEKS-GARDNER, J. M.; GRANTHAM-MCGREGOR, S.M. Physical activity undernutrition and child development. **Proc Nutr Soc.**, v. 53, p. 241-248, 1994.

MOLLACE, V.; RODINO, P.; MASSOUD, R.; ROTICOTI, D.; NISTICO, G. Age-Dependent changes of NO synthase activity in the rat brain. **Biochemical and Biophysical Research communications**, v. 215, n. 3, p. 822-827, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-Arginine a pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1709-1715, 1989.

MONTEIRO, C. A. O panorama da Nutrição infantil nos anos 90 **Caderno de Políticas Sociais** série documentos para discussão, n. 1, maio. 1997.

MONTEIRO, C. A.; BENÍCIO, M. H. D.; FREITAS, I. C. M. **Melhoria em indicadores da Saúde associados à pobreza no Brasil dos anos 90: descrição, causas e impacto sobre desigualdades regionais**, out 1997, 34p.

MORENO, N.; LÓPEZ, J. M.; SÁNCHEZ-CAMACHO, C.; CRESPO, M.; MUÑOZ, M.; GONZÁLEZ, A. Early development of NADPH diaphorase-expressing neurons in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles Waltl*. **Brain Resarch Bulletin**, v. 57 , n. 3/4, p. 409-412, 2002.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRACE, R. J.; BRONZINO, J. D.; TONKISS, J.; GALLER, J. R. Malnutrition and Developing central nervous system. In: **The**

**vulnerable brain and environmental Risks**, v. 1, New York: Malnutrition and Hazard Assessment Plenum Press, 1992. cap. 1, p. 3-44.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J. R. Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 91-128, 1993.

NIEVES JR. C.; LANGKAMP-HENKEN, B. Arginine and immunity: a unique perspective. **Biomed Pharmacother**, v.56, p. 471-482, 2002.

ONÍS, M.; FROGILLO, E. A; BLÖSSENER, M. Is malnutrition declining? An analysis of changes in levels of child malnutrition since 1980. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, p. 1222-1233, 2000.

ONÍS, M.; MONTEIRO, C.; AKRÉ, J.; CLUGSTON, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition an overview from the WHO Global Database on Child Growth. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 6, p. 703-712, 1993.

PAKKARI, I.; LINDSBERG, P. Nitric Oxide in the Central Nervous System. **Annals of Medicine**, v. 27, p. 369-377, 1995.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 4ed. USA: Academic Press, 1998.

PEREIRA JR, A.; FREIRE, M. F.; BAHIA, C. P.; FRANCA, J. F.; PICANÇO-DINIZ, C. W. The barrel field of the adult mouse Sml cortex as revealed by NADPH-diaphorase histochemistry. **NeuroReport**, v.11, p. 1889-1892, 2000.

PÉREZ-SEVERIANO, F.; ESCALANTE, B.; VERGARA, P.; RIOS, C.; SEGOVIA, J. Age-dependent changes in nitric oxide synthase and protein expression in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. **Brain Research**, v. 951, p. 36-42, 2002.

PICANÇO-DINIZ, C. W.; ARAÚJO, M. S.; BORBA, J. M. C.; GUEDES, R. C. A. NADPH-Diaphorase Containing Neurons and Biocytin-labelled Axon Terminals in the Visual Cortex of Adult Rats Malnourished During Development. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, p. 35-48, 1998.

PONTES FILHO, N. T. **Morfometria e Histoquímica do córtex cerebral de ratos jovens submetidos ao álcool e a desnutrição**. 2003. 62 p. Tese (Doutorado em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology**, v. 64, p. 51-68, 2001.

REBECK, G. W.; MARZLOFF, K.; HYMAN, B. T. The pattern of NADPH-diaphorase staining, a marker of nitric oxide synthase activity, is altered in the perforant pathway terminal zone in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 152, p. 165-168, 1993.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JUNIOR, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, p.1939-1951, 1993.

RENNER, M.J.; ROSENZWEIG, R. R. **Enriched and Impoverished Environments. Effects on Brain and Behavior**. New York: Springer, 1987.

RESNICK, O.; MILLER, M.; FORBES, W.; HALL, R.; KEMPER, T.; BRONZINO, J.; MORGANE, P.J. Developmental Protein Malnutrition: Influences on the Central Nervous System of the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, vol. 3, p. 233-246, 1979.

ROCHA-DE-MELO, A. P. **Modificação do estado nutricional no rato recém-nascido, por manipulação do tamanho da ninhada: estudo morfo-funcional do sistema nervoso**. 2001. 68p. Tese (Doutorado em Nutrição)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ROCHA-DE-MELO, A. P.; GUEDES, R. C. A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 663-669, 1997.

SANDELL, J. H. NADPH Histochemistry in the Macaque Striate Cortex. **The Journal of comparative neurology**, v. 251, p. 388-397, 1986.

SANTOS-MONTEIRO, J. **Nutrição, Privação sensorial específica e Plasticidade cerebral** 2002. 83p. Tese (Doutorado em Nutrição)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SCHERER-SINGLER, U.; VICENT S. R.; KIMURA, H.; MCGEER, E. G. Demonstration of unique population of neurons with NADPH diaphorase histochemistry. **Journal Neuroscience Methods**, v.9, p. 229-234, 1983.

SMART, J. Vulnerability of Developing Brain to Undernutrition. **Upsala J. Med. Sci.**, Suppl. 48, p. 21-41, 1990.

SMART, J.L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain II Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. **Brain Research**, v. 28, p. 85-95, 1971.

SMITH JR., T.G.; MARKS, W.B.; LARGE, G.D.; SHERIFF JR., W.H.; NEALE, E.A. A fractal analysis of cell images. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 27, p. 173-180, 1989.

SMRIGA, M.; TORII, K. Prolonged treatment with L-Lysine and L- arginine reduces stress-induced anxiety in an elevated plus maze. **Nutritional Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 125-128, 2003.

SNYDER, S. H. Nitric oxide and neurons. **Current Opinion in Neurobiology**, v.2, p. 323-327, 1992.

SOLTYS, Z.; JANECKO, K.; ORZYLOWSKA-SLIWINSKA, O.; ZAREMBA, M.; JANUSZEWSKI, S.; ODERFELD-NOWAK, B. Morphological transformations of cells immunopositive for GFAP, TrKA or p75 in the CA1 hippocampal area following transient global ischemia in the rat. A quantitative study. **Brain Research**, v. 987, p. 186-193, 2003.

SOBREVIA, L.; NADAL, A.; YUDILEVICH, D. L.; NANN, G. E. Ativation of L-arginine transport (system y+) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. **Journal of Physiology**, v. 490, n. 3, p. 775-781, 1996.

VASCONCELOS, A. P.; MARESCAUX, C.; NEHLIG, A. Age-dependent regulation of seizure activity by nitric oxide in the developing rat. **Developmental Brain Reserarch**, v. 107, p. 315-319, 1998.

WIGGINS, R. C.; FULLER, G.; ENNA, S. J. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. **Life Sciences**, v. 35, p. 2085-2094, 1984.

WU, G. Intestinal Mucosal Amino Acid Catabolism. **Journal Nutrition**, v. 128, p. 1249-1252, 1998.

WU, G.; FLYNN, N. E.; FLYNN, S. P.; JOLLY, C. A.; DAVIS, P. K. Dietary Protein ou Arginine Deficiency Impairs Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthesis by Young Rats. **Journal Nutrition**, v.129, p. 1347-1354, 1999.

YOUNG, V. R.; MARCHINI, J. S. Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 270-89, 1990.

ZHANG, Y.; ZHANG, D.; CAO, Y.; ZHAO, B. Developmental expression and activity variation of nitric oxide synthase in the brain of golden hamster. **Brain Research Bulletin**, v. 58, n. 4, p. 385-389,2002.

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Recife, 25 de novembro de 2002

Ofício nº 110/2002

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Ao Prof. Rubem Carlos de Araújo Guedes  
Departamento de Nutrição da UFPE

Prezado Professor,

Após o recebimento de seu projeto de pesquisa intitulado "**Administração de arginina exógena em ratos lactentes normais e desnutridos: efeitos sobre os neurônios que contêm NADPH-diaforase, no córtex visual**", os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) analisaram os aspectos relativos aos protocolos experimentais adotados.

Concluimos que os procedimentos descritos para o manejo e cuidado dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

De acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos, ressaltamos ainda que o sacrifício dos animais experimentais, realizado no presente trabalho, justifica-se pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico.

Diante do exposto, emitimos um parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Prof.ª Belmira Lara da S. Andrade da Costa

Coordenadora da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE