

Marília Ferreira Frazão

**DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL EM
RATOS ADULTOS TRATADOS COM L-ARGININA
DURANTE O ALEITAMENTO**

RECIFE

2004

Marília Ferreira Frazão

***Depressão Alastrante Cortical em Ratos Adultos Tratados com
L-Arginina Durante o Aleitamento***

Dissertação 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.

MESTRANDA: MARÍLIA FERREIRA FRAZÃO
ORIENTADOR: PROF. Dr. RUBEM CARLOS ARAÚJO GUEDES

RECIFE

2004

Frazão, Marília Ferreira

**Depressão alastrante cortical em ratos adultos
tratados com L-Arginina durante o aleitamento /**
Marília Ferreira Frazão. – Recife: O Autor, 2004.

79 folhas: il., fig., tab.

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2004.**

Inclui bibliografia e anexos.

- 1. Nutrição – Aminoácidos – Tratamento em ratos.**
- 2. Eletrofisiologia – Depressão alastrante cortical –
Ratos adultos. 3. Aminoácidos – Tratamento crônico
- Aleitamento em ratos. I. Título.**

**612.398.192
612.01575**

**CDU (2. ed.)
CDU (21. ed.)**

**UFPE
BC2004-168**

***Depressão Alastrante Cortical em Ratos Adultos Tratados com
L-Arginina Durante o Aleitamento***

Marília Ferreira Frazão

Data de Aprovação da Dissertação: 31 / 03 / 2004

Membros da Banca Examinadora:

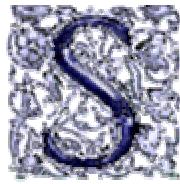
Ana Paula Rocha de Melo

Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa

José Luiz de Lima Filho

Recife, 2004.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (**LAFINNT**) da Universidade Federal de Pernambuco, sob a orientação do **Professor Dr. RUBEM CARLOS ARAÚJO GUEDES**, e na vigência de auxílio (bolsa de Mestrado) concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Contou com a colaboração da mestrandra **LUCIANA MARIA SILVA DE SEIXAS MAIA** de todos os técnicos e demais funcionários, bem como das estudantes de Graduação em Nutrição, **THAYS KALLYNE MARINHO DE SOUSA, MARCELA ARAGÃO GURGEL e MARIANNA BARROS E SILVA** e demais estagiárias do LAFINNT. Para a realização da análise estatística contamos com a colaboração de **LÚCIA MARIA PIRES FERREIRA**.



enhor,

Fazei-me instrumento de vossa paz.

*Onde houver ódio, que eu leve o amor;
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;
Onde houver discórdia, que eu leve a união;
Onde houver dúvida, que eu leve a fé;
Onde houver erro, que eu leve a verdade;
Onde houver desespero, que eu leve a esperança;
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;
Onde houver trevas, que eu leve a luz.*

*Ó Mestre,
Fazei que eu procure mais consolar, que ser consolado;
compreender que ser compreendido;
amar, que ser amado.*

*Pois é dando que se recebe,
é perdoando que se é perdoado,
e é morrendo que se vive para a vida eterna.*

Amém.

Dedico esta tese ao meu marido Flávio.

Depois de várias tentativas em pegar lápis e papel e tentar expressar toda a minha gratidão e amor a você, numa tarde ensolarada de sexta-feira um impulso surgido de um misto de saudade e solidão me levou a fazê-la. Desde que terminei minha graduação, mais um objetivo de vida está sendo alcançado. Fico feliz por isto, me sinto especial e agradecida a todos que me fizeram aqui chegar. Você, Flávio, foi sem dúvida nenhuma a maior força que me impulsionou à concretização deste sonho. Tudo aquilo que tanto precisei nesta caminhada, você foi capaz de me proporcionar. Apesar dos vários momentos de ausência, exigida pela sua profissão, você conseguiu me ajudar incondicionalmente, desde a elucidação de uma dúvida no inglês ao apoio nas horas difíceis. Dedico esta tese a você de uma forma simbólica, na verdade dedico e continuarei dedicando todo o meu amor, companheirismo, e respeito, sempre. Por não possuir o dom de expressar em palavras meus sentimentos, permita-me lhe oferecer um dos tantos poemas que você fez para mim. Este, em especial, consegue sintetizar tudo aquilo que sua companhia me faz sentir.

*Não sabia que te amar,
Que viver com teu amor,
Com paixão e com fervor,
Fosse tão essencial quanto um simples respirar.*

*Te ver me faz parar,
Alivia o meu temor
Me traz paz e bem-estar,
Com você eu sei que sou.*

Marília.

Agradecimentos

A Deus,

Pela força infinita e constante, responsável por possibilitar a concretização de mais um ideal, e por conduzir de forma plena minha felicidade.

Aos meus pais (Arinaldo e Socorro),

*Pelo aprendizado de vida dado durante todos esses anos, pelo apoio emocional e aconchego tranquílo nas horas difíceis. Essa vitória não é só minha, é de vocês. **Mainha e Painho, amo muito vocês!***

Aos meus irmãos (Elton, Yara e Emanuel),

*Obrigada pela amizade, pelo orgulho que sentem de mim e pelo zelo de sempre. **Amo vocês!!***

Ao meu orientador, Professor Rubem,

Nem sei o que escrever nesse momento, só queria que o Sr. soubesse que agradeço por ter acreditado e confiado em minhas palavras quando o procurei pela primeira vez. Depois desses dois anos convivendo diariamente com o Sr. posso dizer que aprendi muito através do seu senso crítico de pesquisador, sempre me incentivando a alçar vôos altos em busca do conhecimento e a acreditar em meu potencial. Obrigada pela amizade, pela sinceridade de sempre, pelos conselhos de vida e apoio nas horas difíceis. O Sr. estará sempre no meu coração como uma pessoa muito querida e exemplo de um verdadeiro Mestre.

*Às minhas colegas de mestrado em especial a **Luciana Maia**,*

Foi muito bom ter convivido com vocês durante as aulas do Mestrado, obrigada pela acolhida aqui em Recife, saibam que nunca esquecerei vocês. Lú, agradeço por você ter acreditado na minha capacidade, não apenas de trabalho, mas sobretudo de companheirismo e amizade.

*A todos que fazem o **LAFFINT**,*

*A todas as **estagiárias** e em especial (Thays, Marianna e Marcela), **doutorandas** (Raquel, Ângela e Graça), a todos os professores e funcionários e em especial a **Profª Ana Paula**, pela amizade sincera e ajuda de sempre. Agradeço também pela disponibilidade: **Necy** (secretária da Pós-graduação), **Fernanda** (secretária do LAFINNT), **Lúcia** (estatística), e ao pessoal que faz o Biotério de Nutrição: **Zé Paulino**, **Hamilton** e **Dr. França**, em especial.*

Marília Ferreira Frazão

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	3
Lista de Figuras	4
Lista de Tabelas	5
Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução	
1.1. Nutrição e Sistema Nervoso	8
1.2. O Papel da L-arginina para o Tecido Cerebral	11
1.3. O Fenômeno da Depressão Alastrante	16
2. Justificativa	19
3. Hipóteses	20
4. Objetivos	
4.1. Geral	21
4.2. Específicos	21
5. Material e Métodos	
5.1. Animais	22
5.2. Manipulação Nutricional	23
5.3. Procedimento de Gavagem	25
5.4. Preparação das Soluções	26
5.5. Determinação de Peso Corporal	27

5.6. Procedimento Cirúrgico	28
5.7. Estimulação Cortical e Registro Eletrofisiológico	29
5.8. Peso do Encéfalo	30
5.9. Análise Estatística	31
6. Resultados	
6.1. Pesos Corporal e Encefálico	32
6.2. Velocidade de Propagação da Depressão Alaстрante.....	38
7. Discussão	42
8. Conclusões	57
9. Perspectivas	58
10. Referências Bibliográficas	59
Anexo 1	77
Anexo 2	78
Anexo 3	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ARG	L-Arginina
bNOS	Sintase do Óxido Nítrico Cerebral (brain-NOS)
C	Controle
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
DA	Depressão Alastrante
DBR	Dieta Básica Regional
ECoG	Eletrocorticograma
EDRF	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
eNOS	Sintase do Óxido Nítrico Endotelial (endothelial- NOS)
HIS	L-Histidina
iNOS	Sintase do Óxido Nítrico Induzível (inducible-NOS)
LAFINNT	Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
L-NAME	Inibidor da NOS: N _A -nitro-L-arginina-metil ester
L-NO ARG	Inibidor da NOS: N ^G -nitro-L-arginina
N₁₂	Ninhada maior (doze filhotes por mãe)
N₆	Ninhada menor (seis filhotes por mãe)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintase do Óxido Nítrico
NP	Nitroprussiato de Sódio
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VLV	Variação Lenta de Voltagem

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Estrutura química da L-Arginina	11
Figura 2 - Reação da síntese do óxido nítrico a partir da arginina	13
Figura 3 - Procedimento de gavagem	26
Figura 4 - Evolução ponderal dos animais	34
Figura 5 - Exemplos de registros eletrofisiológicos	39
Figura 6 - Velocidades médias de propagação da depressão alastrante	41

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Evolução ponderal dos animais	33
Tabela 2 - Pesos encefálicos dos animais	37
Tabela 3 - Velocidades médias de propagação da depressão alastrante	40

RESUMO

Como um precursor essencial para a síntese de moléculas protéicas com grande importância biológica, a arginina apresenta marcável versatilidade metabólica e regulatória. O Óxido Nítrico (NO), gerado a partir da arginina, exerce papel multifuncional no sistema nervoso, incluindo modulação da liberação de neurotransmissores, regulação do fluxo sanguíneo local cerebral e plasticidade sináptica. Estudo recente tem sugerido que a sinalização mediada pelo óxido nítrico está envolvida na depressão alastrante cortical (**DA**; Wang et al., *Neuropharmacol.* 44:949-957, 2003). Nós investigamos em ratos o efeito da administração de L-arginina (**ARG**) combinado ao estado nutricional, durante o período do aleitamento, na propagação da depressão alastrante cortical (**DA**), em ratos adultos. Ratos Wistar foram amamentados em ninhadas de 6 ou 12 filhotes por mãe (respectivamente **N₆** e **N₁₂**). Nesse período os filhotes receberam, por gavagem, ou solução contendo o aminoácido **ARG** (5, 10, 20 mg/dia respectivamente, durante a primeira, segunda e terceira semana de tratamento), ou L-histidina (**HIS** – 7, 14, 28mg/dia respectivamente, durante a primeira, segunda e terceira semana de tratamento) ou água destilada (**C**). Os pesos corporais foram obtidos nos dias 7/14/21/25/30/60/90 e no dia do registro eletrofisiológico. Os animais foram submetidos ao registro da **DA**, por 4 horas, quando tornaram-se adultos (90 – 110 dias). A **DA** foi deflagrada a cada 20 min pela aplicação de KCl a 2%, por 1 min, na região do córtex frontal, e registrada durante 4 horas em 2 pontos do córtex parietal, através do eletrocorticograma e da variação lenta de voltagem (VLV) que acompanha a **DA**. Ao final do registro, foram determinados os pesos encefálicos úmidos. Os animais **N₁₂** apresentaram pesos corporais e encefálicos menores e velocidades da **DA** maiores do que os respectivos grupos **N₆**. Aos 90 dias de vida, os animais **ARG-N₆** apresentaram pesos corporais estatisticamente superiores aos dos grupos **HIS-N₆** e **C-N₆**. Tais achados não foram encontrados nos animais desnutridos precocemente. Nos animais **N₆**, mas não nos **N₁₂**, os ratos tratados com **ARG** apresentaram altas velocidades de **DA**, quando comparado com o grupo **C-N₆**. Esses dados concluem que: 1) aumento da ninhada de 6 para 12 filhotes foi efetivo ao alterar os pesos corporal e encefálico de acordo como já descrito anteriormente; 2) tratamento precoce com **ARG-N₆** aumenta a susceptibilidade cortical à **DA** a julgar pelas altas velocidades, sugerindo a participação deste aminoácido na **DA**; 3) o déficit nutricional induzido pela condição **N₁₂** alterou o efeito da **ARG** na **DA**.

ABSTRACT

As an essential precursor for the synthesis of protein molecules with enormous biological importance, arginine displays remarkable metabolic and regulatory versatility. Nitric oxide (NO), generated from arginine, has multifunctional roles in the nervous system, including modulation of neurotransmitter release, regulation of local cerebral blood flow and synaptic plasticity. Recent studies strongly suggest that nitric oxide-mediated signaling is involved in the phenomenon of cortical spreading depression (SD; Wang et al., *Neuropharmacol.* 44:949-957, 2003). We investigated in rats the effects of administration of L-arginine (**ARG**) combined to nutritional status, during the suckling period, on the propagation of SD, in adulthood. Wistar rat pups were suckled in normal (**N**) or large (**L**) litters (respectively 6 and 12 pups/litter). During suckling, the pups received, by gavage, either ARG (5, 10 and 20 mg/day, respectively, during the first, second and third weeks of treatment), L-histidine amino acid (7, 14 and 28 mg/day, respectively, during the first, second and third weeks of treatment) or distilled water (**C**). Body weights were obtained at days 7/14/21/25/30/60/90 and in the day of SD-recording. SD recording was performed, for 4 hours, in the pups at adult (90 – 110 days of life) ages. SD was elicited every 20 min by KCl (2% solution), applied for 1 min to a point of the frontal cortex region and recorded at 2 points of the parietal cortex, by means of the electrocorticogram and of the recording of the slow potential change accompanying at the end of the SD-recording session. Wet brain weight was obtained at the end of the SD-recording session. **L**-animals presented lower body and brain weights, as well as higher SD-velocities of propagation than the **N** ones. In **N**-animals, but not in the **L** ones, **ARG** treated rats displayed higher SD-velocities, as compared to the water-treated group. It is concluded that 1) increasing the litter size from 6 to 12 pups was effective in altering body- and brain weights; 2) early treatment with **ARG** increased the brain SD-susceptibility in adulthood, as judged by the higher SD velocities, suggesting a role of this amino acid on SD; 3) the nutritional deficit induced by the **L** condition did alter the **ARG** effect on SD.

1. Introdução

1.1. Nutrição e Sistema Nervoso

Uma nutrição equilibrada é aquela decorrente da ingestão de alimentos adequados a fim de assegurar as necessidades nutricionais do organismo que os ingere. Deve, portanto, ser suficiente para contemplar as necessidades energéticas e de nutrientes para as sínteses orgânicas; deve ser também harmoniosa, de modo que os diferentes nutrientes guardem uma correta relação entre si, e adequada à situação biológica do indivíduo (OMS, 1984).

Em condições normais de saúde e durante todos os períodos do ciclo vital, o ser humano precisa consumir alimentação equilibrada, que é fundamental para promover o bem-estar físico, mental e social, bem como propiciar uma boa qualidade de vida. Os alimentos são os veículos de nutrientes para o organismo humano (carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas, sais minerais, fibras alimentares e água), imprescindível para assegurar a produção de energia, a construção, reparação e manutenção dos tecidos e o controle dos processos vitais (Cavalcanti, 1995).

Por outro lado, um desequilíbrio e/ou uma deficiência de nutrientes no organismo é caracterizado como desnutrição (Martorell, 2001). Tais desequilíbrios são freqüentemente produzidos pela deficiência relativa de proteínas, de carboidratos e de gorduras, como fonte de energia, bem como pela carência de micronutrientes. Estas deficiências são seguidas de alterações fisiopatológicas que primeiro refletem-se em

prejuízo funcional, e posteriormente, por danos bioquímicos e físicos (Martinez, 2001), podendo causar incapacidade e morte (Martorell, 2001).

A nutrição desempenha um papel crítico no desenvolvimento pré-natal e pós-natal do cérebro em todos os níveis, incluindo estrutural, químico, farmacológico e funcional (Prasad, 1998; Fernstrom, 2000). No passar de poucas décadas tem se tornado claro que além dos nutrientes clássicos da dieta muitos outros constituintes influenciam a função cerebral, como por exemplo, o aminoácido triptofano que é precursor do neurotransmissor serotonina (Fernstrom, 2000). Para alguns nutrientes, os efeitos até agora notados são bioquímicos. Para outros, efeitos funcionais e comportamentais têm sido observados (Fernstrom, 2000). Muitas das substâncias neurotransmissoras (substâncias neuroativas) estão presentes em nossa alimentação, ou são ressintetizadas usando precursores fornecidos pela dieta e, portanto, podem influenciar diretamente na química cerebral (Prasad, 1998). Assim, uma deficiência em nutrientes particulares durante a concepção, embriogênese e desenvolvimento cerebral pode levar a notáveis efeitos no cérebro (Fernstrom, 2000).

A função básica do sistema nervoso é gerar comportamentos, grande parte dos quais são, em nossa espécie, aprendidos durante a própria vida. A capacidade para aprender é uma das características marcantes dos seres humanos, o que se torna um objeto essencial no estudo dos efeitos da desnutrição sobre o sistema nervoso (Guedes, 1985). Vários efeitos da desnutrição na estrutura e função neurais têm sido descritos em seres humanos, bem como em animais de laboratório (Morgane et al, 1978; Morgane et al, 1993). Esses efeitos envolvem alterações na gênese celular, no arranjo arquitetônico celular e mudanças na plasticidade sináptica, que podem ser acessados por estudos

anatômicos qualitativos e análises funcionais (Morgane et al, 1993). Os efeitos são mais severos quando a deficiência nutricional ocorre durante o período crítico do crescimento rápido cerebral (Dobbing, 1968; Martorell, 2001). Em particular, o termo “período crítico” refere-se ao período em que ocorre um “pico” de atividade de eventos específicos como neurogênese, migração celular, diferenciação celular, etc. Nesse período, as áreas cerebrais tendem a desenvolver-se em “saltos” rápidos, em preferência a um processo contínuo e lento (Morgane et al, 1993), e o cérebro tem seu peso aumentado de maneira particularmente acelerada (Dobbing e Smart, 1974). No rato, este período corresponde às três primeiras semanas de vida neonatal, isto é, o período da lactação (Dobbing, 1968).

Os efeitos neurais da desnutrição irão depender do seu grau de severidade e duração, como também do período em que o insulto ocorre (Melo, 1994; Rocha-de-Melo e Guedes, 1997). A desnutrição durante o período pré e pós-natal acarreta um retardamento na maturação reflexa e somática e esse retardamento é mais severo em animais que sofreram desnutrição no período do aleitamento (Smart e Dobbing, 1971). Em modelos animais, um ponto de consenso a respeito das consequências funcionais da desnutrição é que os animais expostos precocemente a este insulto exibem mudanças duradouras no campo das emoções, motivações e/ou ansiedade (Levitsky e Strupp, 1995), além de alterações morfológicas (Picanço-Diniz et al, 1998), fisiológicas, bioquímicas e comportamentais (Resnick et al, 1979).

Apesar de muitos estudos já realizados, abordando a interferência de variáveis nutricionais sobre o desenvolvimento do sistema nervoso, muitos questionamentos precisam ainda ser esclarecidos, principalmente a influência de alguns aminoácidos

específicos durante o período de maior vulnerabilidade do crescimento cerebral em ratos nutridos e desnutridos. O aminoácido Arginina vem se tornando alvo de muitas pesquisas no campo da neurociência, pelo seu papel no cérebro. A arginina, através do seu reconhecimento como precursora do óxido nítrico tem despertado o interesse para o seu papel como modulador e transmissor da função neuronal, como se descreve a seguir.

1.2. O Papel da L-Arginina para o Tecido Cerebral

O aminoácido básico Arginina (ácido 2-amino-5-guanidinovalérico) (Böger e Bode-Böger, 2001) foi isolado primeiramente a partir de brotos de tremoço, no ano de 1886 (Schulze, 1886, apud Böger e Bode-Böger, 2001) e em 1895 foi identificada na proteína de mamíferos por Hedin (Hedin, 1895 apud Böger e Bode-Böger, 2001). Esse aminoácido contém em sua estrutura quatro átomos de nitrogênio por molécula, tornando-se o mais abundante carreador de nitrogênio em humanos e animais (Appleton, 2002) (**FIGURA 1**).

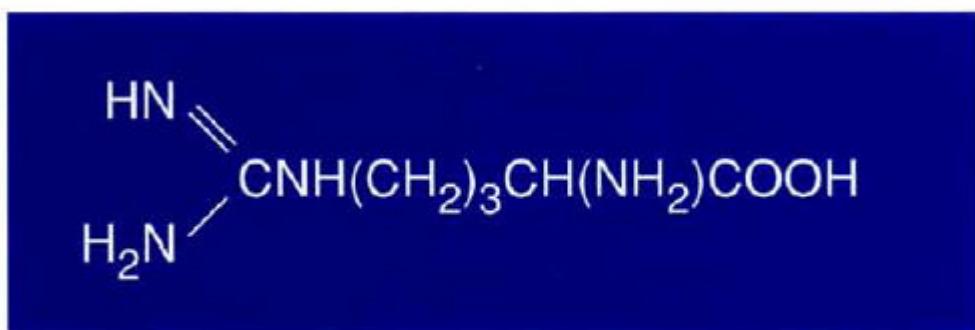


FIGURA 1 - Estrutura química da L-Arginina (APPLETON, J. Alt Med Rev, v. 7, p. 512-522, 2002)

Atualmente há muita controvérsia a respeito da essencialidade da arginina. Para Peck e col. (1995) e Appleton (2002), a arginina é considerada um aminoácido não essencial para adultos saudáveis. Já para Böger e Bode-Böger (2001) a arginina é

essencial, devido a homeostase das suas concentrações plasmáticas ser regulada pela ingestão dietética, turnover protéico, síntese e metabolismo. Para outros autores a arginina é um aminoácido semi-essencial para o crescimento de mamíferos, pois sua taxa de síntese endógena não satisfaz seus requerimentos para um crescimento ótimo (FAO, 1985; Viseck, 1985; Filho e Zilberstein, 2000).

No ser humano a arginina é um composto intermediário do ciclo da uréia. Porém ela também apresenta significante efeito na função endócrina (Appleton, 2002) estimulando a secreção dos hormônios pancreáticos (Palmer et al, 1975) e pituitários (Waitzberg e Logullo, 2000; Flynn et al, 2002), fator de crescimento insulina-símile e fatores de crescimento da pituitária (Waitzberg e Logullo, 2000), além de participar no aumento da liberação da somatotropina (Kapazi, 2000). Deste modo, a arginina exerce certa influência na regulação do metabolismo das proteínas, aminoácidos, glicose e ácidos graxos (Flynn et al, 2002). Todos os efeitos fisiológicos da arginina atualmente conhecidos são devidos aos produtos formados a partir do seu catabolismo, tais como ornitina, prolina, poliaminas, creatina, agmatina, glutamato e óxido nítrico, que podem mediar os efeitos benéficos da arginina aumentando sua ação fisiológica para cada célula e para as funções orgânicas do corpo (Flynn et al, 2002).

Dos diversos produtos do metabolismo da arginina, o óxido nítrico (NO) tem se destacado por desempenhar inúmeras funções biológicas (Robbins e Grisham, 1997), atuando como um fator importante em uma ampla faixa de processos fisiológicos (Grant et al, 2002; Flynn et al, 2002). As recentes descobertas da via óxido nítrico ? arginina tem unido áreas de pesquisa tradicionalmente diversificadas na bioquímica, imunologia,

patologia, fisiologia, nutrição e neurociência, e tem estimulado o interesse renovado na nutrição da arginina em animais e humanos.

No organismo dos mamíferos, o óxido nítrico é sintetizado em diversos tipos celulares (Prast e Philippu, 2001), a partir do aminoácido arginina, através da clássica reação química em que a L-arginina, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) é transformada em um intermediário, a N^G-hidroxi-L-arginina com a presença de co-fatores como NADPH e Ca⁺⁺, sendo necessário mais NADPH e O₂ para a formação de citrulina e óxido nítrico (NO) (Filho e Zilberstein, 2000) (**FIGURA 2**). Nesta reação, um dos grupos guanidino equivalentes quimicamente da L-arginina é oxidado por cinco elétrons, sendo esta uma reação estereoespecífica em que apenas a forma L-Arginina, mas não a D-Arginina, é clivada pela NOS, formando citrulina e NO (Robbins e Grisham, 1997). Até o momento, foram isoladas e clonadas três isoenzimas, sendo duas constitutivas, bNOS (brain-NOS) e eNOS (endothelial-NOS), e uma outra induzível iNOS (inducible-NOS) (Filho e Zilberstein, 2000; Grant et al, 2002).

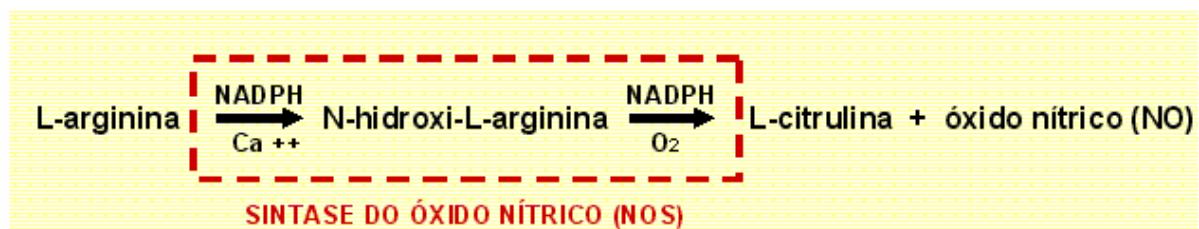


FIGURA 2 - Principais etapas da síntese de NO a partir da L-Arginina (FILHO e ZILBERSTEIN, Rev Ass Med Bras, 46:26- 2000)

O NO é um importante mensageiro intercelular (Marletta e Spiering, 2003). Diversos trabalhos têm relatado sua ação como mensageiro no sistema cardiovascular (Hare e Colucci, 1995; Faraci, 1996), sistema imunológico (Fisher, 1954; Marletta e Spiering, 2003), sistema renal (Albrecht et al, 2003), sistema bronco-pulmonar (Robbins

e Grisham, 1997) e sistema nervoso (Garthwaite, 1991; Hu e El-Fakahany, 1996; Brenman e Bredt, 1997; Strijbos, 1998; Prast e Philippu, 2001).

A função do NO no sistema nervoso central (SNC) é múltipla (Robbins e Grisham, 1997). Pensa-se que sua rápida difusão e a capacidade para modular vias de transdução e atividade neuronal conferem a este gás a função de um mensageiro cerebral (Marletta e Spiering, 2003). Estudos também têm sugerido o envolvimento do NO na liberação de neurotransmissores como acetilcolina, aminoácidos excitatórios e inibitórios, catecolaminas, histamina, serotonina e adenosina (Prast e Philippu, 2001). O NO está envolvido na plasticidade sináptica no hipocampo, (Filho e Zilberstein, 2000) e em diversas outras regiões cerebrais como cerebelo (Bredt e Synder, 1992), córtex, amigdala e estriado, possuindo também papel chave na função cognitiva, emocional e/ou funções comportamentais (Prast e Philippu, 2001). Vários estudos apontam para a função da atividade do receptor NMDA e a produção do NO em passos chaves do desenvolvimento neural, tais como a neurogênese (Contestabile, 2000), proliferação e diferenciação (Garthwaite, 1991; Gibbs, 2003; Cheng et al 2003), migração e sinaptogênese neuronal (Gally et al, 1990; Contestabile, 2000; Ogilvie et al, 1995).

Através de observações funcionais e imunológicas, Riobó e colaboradores (2002) indicaram que a síntese do óxido nítrico mitocondrial cerebral (mtNOS) seria responsável pela modulação do desenvolvimento cerebral, uma vez que é altamente expressada e ativa nos estágios tardios do desenvolvimento fetal e durante os primeiros dias de vida pós natal, sugerindo um papel essencial para o NO nas fases cronológicas de maturação cerebral e plasticidade sináptica. Para Keilhoff et al (1996), a presença da NOS no tecido cerebral embrionário e nos estágios pós-natal precoce propõem a questão

de seu papel funcional atuando como um mensageiro retrógrado para o crescimento neuronal.

Por outro lado, devido o NO ser um radical livre, quimicamente reativo (Dawson e Dawson, 1996a; Böger e Bode-Böger, 2001), quando presente em altas concentrações, pode iniciar uma cascata neurotóxica (Dawson e Dawson, 1996a). Ao interagir com radicais livres e formar produtos finais muitas vezes citotóxicos e altamente reativos (Strijbos, 1998; Rodrigo et al, 2000), o NO pode participar de processos fisiopatológicos que emergirão em uma variedade de desordens no sistema nervoso central (Dawson e Dawson, 1996b). Tais eventos têm sido relacionados à gênese de doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson (Ebadi e Sharma, 2003), doença de Alzheimer (De La Monte et al, 2003) e doença de Huntington (Deckel, 2001).

Uma função do NO que tem despertado o interesse de muitos estudiosos, além da participação no desenvolvimento neuronal, é o papel do NO na regulação da circulação cerebral (Faraci, 1996). Essa função foi atribuída ao NO devido à sua responsabilidade pela atividade biológica do EDRF (fator relaxante derivado do endotélio) (Furchtgott et al, 1984; Brenman e Bredt, 1997). Faraci (1996) sugere que o NO mediaria o aumento no fluxo sanguíneo neuronal local em resposta a diversos estímulos, incluindo aminoácidos excitatórios, bem como o aumento na atividade neuronal e metabolismo. Essa função do NO também tem sido associada à hiperemia que ocorre no fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DA).

A DA foi utilizada, no presente trabalho, como modelo experimental, dentro da linha de pesquisa que nosso laboratório vem desenvolvendo. As principais

características da DA, bem como uma breve descrição dos dados anteriormente obtidos no laboratório, envolvendo esse curioso fenômeno, são, a seguir, apresentados.

1.3. O Fenômeno da Depressão Alastrante

O fenômeno da DA foi primeiramente observado e descrito por Aristides Leão, em meados da década de 40 (Leão, 1944), durante estudos sobre epilepsia experimental, utilizando registros da atividade elétrica cortical cerebral em coelhos anestesiados. Este fenômeno consiste em uma reversível e acentuada diminuição (depressão) da atividade elétrica espontânea, em resposta à estimulação de um ponto cortical (estímulo mecânico, químico ou elétrico). A DA propaga-se, a partir daí, de forma concêntrica e com velocidade aproximadamente uniforme por todo o córtex (velocidade da ordem de 2 a 5 mm/min). Enquanto o local inicialmente deprimido se recupera, a depressão da atividade se alastra por regiões mais distantes. A recuperação completa se dá em torno de 10 a 15 minutos (Leão, 1944; Leão, 1947). Simultaneamente à DA, ocorre uma variação lenta de voltagem (VLV) na região cortical invadida pelo fenômeno. Com isto, o córtex torna-se negativo em relação a um ponto de voltagem fixa. Essa variação negativa de amplitude variando entre 5 – 20 mV, é eventualmente precedida, e freqüentemente seguida por uma fase positiva de menor amplitude (Leão, 1951).

Várias hipóteses e evidências clínicas têm sugerido a associação da DA com algumas neuropatologias humanas, incluindo a epilepsia (Leão, 1944; Leão, 1972), a enxaqueca com aura (Parsons e Strijbos, 2003), doenças cerebrovasculares, traumatismo craniano e amnésia transitória global (Gorji, 2001).

De acordo com alguns estudos acerca da DA, verificou-se que algumas condições podem modificar a susceptibilidade cortical ao fenômeno, e dentre elas destacam-se: a estimulação ambiental, modificação da atividade de sistemas neurotransmissores, alterações hormonais e metabólicas, e o estado nutricional (Guedes et al, 1987a,b; 2002; Santos-Monteiro et al, 2000; Guedes e Pereira-da-Silva, 1993; Guedes et al, 1996; Guedes e Cavalheiro, 1997; Rocha-de-Melo e Guedes, 1997; Costa-Cruz e Guedes, 2001).

Dentro das diversas variáveis estudadas, a nutricional apresenta grande destaque, pois a falta ou excesso de nutrientes é responsável por causar um desbalanço, que em muitos casos poderá acarretar graves danos fisiológicos, alterando as condições do tecido cerebral e influenciando na susceptibilidade cortical ao fenômeno da DA (Rocha-de-Melo, 2001). Em algumas situações, o córtex torna-se mais sensível ao fenômeno, com velocidades de propagação mais altas, ao passo que em outros casos se torna mais resistente, com velocidades de propagação mais baixas.

O Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Tedósio – LAFINNT tem desenvolvido estudos verificando a influência de variáveis nutricionais e outras condições de importância clínica sobre a incidência e a propagação da DA. Algumas condições de interesse em nutrição têm sido estudadas e demonstraram que podem modificar a susceptibilidade cortical ao fenômeno, diminuindo a velocidade de propagação, tais como, o tratamento com lítio (Guedes et al, 1989); a hiperglicemia (Ximenes-da-Silva e Guedes, 1991; Costa-Cruz e Guedes, 2001); o hipotireoidismo (Guedes e Pereira-da-Silva, 1993). Por outro lado, outras condições aumentam a velocidade de propagação, tais como, o consumo de álcool (Guedes e Frade, 1993), a

hipoglicemia (Ximenes-da-Silva e Guedes, 1991; Costa-Cruz e Guedes, 2001), o hipertireoidismo (Santos, 2000) e a deficiência nutricional (Andrade et al, 1990; Rocha-de-Melo e Guedes, 1997).

Diversos autores têm confirmado experimentalmente a função do NO atuando como um agente vasodilatador simultâneo à depressão alastrante cortical (Collona et al, 1994; Faraci, 1996; Shimizu et al, 2002; Goadsby et al, 1992; Wang et al, 2003). Outros autores têm estudado mudanças no fluxo sanguíneo ocorridas durante a depressão alastrante em mamíferos tratados com N^G -nitro-L-arginina (L-NO ARG), um éster metil, bloqueador da síntese de óxido nítrico (Read et al, 1997; Obrenovitch et al, 2002). Por outro lado, Read e Parsons (1998), estudando o papel do NO na mediação da regulação cerebrovascular durante a DA em ratos, evidenciou um aumento nas concentrações locais de NO, mas não responsável por mediar a hiperemia induzida pela DA.

A ARG é um aminoácido conhecido pelas inúmeras funções metabólicas que desempenha no organismo, sendo o NO, responsável por grande parte dessas funções, dentre elas a de modulador universal da função neuronal ao nível do SNC. As investigações do presente trabalho foram traçadas no sentido de se estudar em ratos adultos os efeitos da administração crônica de L-arginina, combinada a manipulação do estado nutricional durante o período do aleitamento, na velocidade da depressão alastrante cortical (DA).

2. Justificativa

No presente trabalho, propõe-se um estudo eletrofisiológico no córtex de ratos criados em ninhadas de tamanhos diferentes, tratados, ou não, com o aminoácido L-arginina, precursor enzimático do óxido nítrico. Apesar do crescente interesse no estudo das relações entre a ação do óxido nítrico no sistema nervoso e o seu papel na depressão alastrante, ainda não se tem investigado os efeitos tardios (após o desmame do rato - na idade adulta) sobre a DA, consequentes à manipulação precoce da L-arginina durante o aleitamento (período crítico de crescimento rápido cerebral). O resultado das investigações nos permitirá entender melhor o papel do óxido nítrico durante o desenvolvimento do sistema nervoso e sua repercussão para a vida adulta, verificando se o tratamento precoce com o aminoácido ARG provocará mudanças permanentes que poderão influenciar na susceptibilidade cortical à depressão alastrante.

3. Hipóteses

- A administração de L-Arginina no início da vida afetaria a susceptibilidade cortical a DA, em ratos adultos;
- A administração de L-Arginina no início da vida afetaria o peso corporal durante o tratamento e na idade adulta;
- A administração de L-Arginina afetaria o peso encefálico, em ratos adultos;
- O efeito da L-Arginina sobre a DA seria independente da quantidade de nitrogênio oferecida a partir do tratamento com este aminoácido.

4. Objetivos

4.1. Geral

Investigar os efeitos da administração de L-Arginina em ratos lactentes (a partir do 7º até o 28º dia de vida), associada à manipulação do tamanho da ninhada, sobre o desenvolvimento corporal e encefálico, bem como sobre a atividade elétrica cerebral.

4.2. Específicos

- Durante o crescimento corporal pós natal:

- Investigar a evolução do peso corporal dos filhotes até se tornarem adultos;

- Na vida adulta:

- Avaliar os efeitos do tratamento dietético precoce com L-Arginina sobre o peso do encéfalo, quando os filhotes se tornarem adultos;
- Determinar a suscetibilidade cortical à DA, através de sua incidência e propagação.

5. Materiais e Métodos

5.1. Animais

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, de acordo com as normas vigentes que trata da questão do uso de animais para fins científicos (**ANEXO 1**). Foram utilizados 94 ratos albinos machos, da linhagem Wistar, obtidos da colônia de criação mantida pelo Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram mantidos sob condições padrão do biotério com temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$, e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luz das 06 às 18h). Os animais tiveram livre acesso a água filtrada e ração comercial padrão do biotério contendo 23% de proteína (“LABINA” – Agribands Purina do Brasil Ltda) (**ANEXO 2**).

Para obtenção dos animais experimentais, foram acasalados ratos com idade entre 90 e 120 dias, na proporção de 3 fêmeas para 1 macho, o qual permanecia com as ratas durante 1 semana, e após este período era retirado da gaiola. Quando confirmado o estado de gestação, com a observação do desenvolvimento do ventre, as fêmeas eram transportadas separadamente para as gaiolas-maternidade. Um dia após o nascimento dos filhotes (considerado como primeiro dia de vida), as ninhadas foram ajustadas para dois tamanhos: 6 e 12 filhotes por mãe (**N₆** e **N₁₂**, respectivamente). Para Fishbeck e Rasmussen (1987) o número de 6 filhotes por mãe parece ser o que confere o maior potencial lactotrófico, deste modo, este padrão de filhotes por ninhada foi utilizado para se obter o modelo de ninhadas normonutridas. O número de 12 filhotes por mãe foi utilizado seguindo o modelo da técnica de grandes ninhadas (De Luca et al, 1977;

Tonkiss et al, 1988). O aumento do número de filhotes competindo pelo leite materno serve como modelo para o estudo da desnutrição experimental (Fuller e Wiggins, 1984; Rocha-de-Melo, 2001; Araújo, 2003). Prevendo eventual mortalidade, a cada ciclo de acasalamentos eram mantidas ninhadas “reserva” com 6 e 12 filhotes, com o intuito de completar alguma ninhada eventualmente desfalcada durante o tratamento experimental. Após o desmame, realizado aos 25 dias, os ratos foram colocados em gaiolas (com 4 a 6 animais por gaiola) e passaram a receber dieta comercial padrão do biotério (“LABINA”) e água *ad libitum*.

Durante o período experimental, do 7º ao 28º dia de vida pós natal, os animais foram divididos em distintos grupos experimentais de acordo com a descrição abaixo.

5.2. Manipulação Nutricional

Os animais provenientes de ninhadas com 6 e 12 filhotes foram divididos em 5 grupos experimentais, de acordo com o tratamento imposto no período do aleitamento (7º ao 28º dia de vida), desta maneira:

- **Grupo Arginina Nutrido (ARG-N₆)** (n=18) – constituído de filhotes que durante o período do aleitamento foram criados em ninhadas menores (N₆), e submetidos por 3 semanas, à administração de uma solução aquosa contendo o aminoácido L-arginina por sonda orogástrica.

- **Grupo Arginina Desnutrido (ARG-N₁₂)** (n=17) – este grupo foi tratado com L-arginina, da mesma forma que o grupo anterior, exceto que os filhotes provieram de ninhadas maiores (N₁₂).
- **Grupo Água Nutrido (C-N₆)** (n=22) – constituído de filhotes que durante o período do aleitamento foram criados em ninhadas menores (N₆), e submetidos por 3 semanas, à administração de água por sonda orogástrica.
- **Grupo Água Desnutrido (C-N₁₂)** (n=19) – este grupo foi tratado com água, da mesma forma que o grupo anterior, exceto que os filhotes provieram de ninhadas maiores (N₁₂).
- **Grupo Histidina Nutrido (HIS-N₆)** (n=18) – constituído de filhotes que durante o período do aleitamento foram criados em ninhadas menores (N₆), e submetidos por 3 semanas, à administração de uma solução aquosa contendo o aminoácido L-histidina por sonda orogástrica.

O aminoácido L-histidina foi utilizado como controle para a L-arginina, em relação ao fornecimento do nitrogênio. A histidina foi escolhida por possuir quantidade de nitrogênio próximo à do aminoácido L-arginina (L-histidina – C₆H₉N₃O₂ e L-arginina - C₆H₁₄N₄O₂), e por utilizar o mesmo sistema de transporte de membrana que a L-arginina. Com o conhecimento das quantidades de nitrogênio e peso molecular dos dois aminoácidos, foram calculadas as doses de L-histidina com quantidades de nitrogênio iguais às oferecidas na solução de L-arginina, sendo as mesmas 7,0mg/dia,

14mg/dia e 28mg/dia, diluídas em 0,5ml, 1,0ml e 1,0ml de água destilada, respectivamente nas três semanas do tratamento experimental.

O tratamento experimental foi realizado diariamente, durante 21 dias (3 semanas), sempre no período das 12 às 14 horas. A via de administração (sonda orogástrica) foi escolhida pela característica fisiológica da mesma.

5.3. Procedimento de Gavagem

Para realização do procedimento de gavagem foram utilizadas seringas de vidro com capacidade de 1,0 ml e tubos finos de polietileno (cânula) com diâmetro de aproximadamente 0,5 mm e com cerca de 15 cm de comprimento. Uma de suas extremidades servia para encaixe na agulha da seringa. Com o auxílio dos dedos indicador e polegar da mão esquerda, os filhotes eram contidos e posicionados verticalmente, com a cabeça levemente repuxada para trás, deixando plana a curvatura anatômica entre tórax e boca. Simultaneamente, com a mão direita, a outra extremidade da cânula era lentamente introduzida na cavidade oral. A extensão da cânula, a ser introduzida, foi previamente calculada e demarcada, para facilitar sua introdução até a porção inferior da cavidade gástrica. A solução era administrada lentamente, tendo-se o cuidado de evitar bolhas de ar, a fim de minimizar a distenção gástrica. A **FIGURA 3** ilustra o procedimento de gavagem realizado nos animais.



FIGURA 3 – Procedimento de gavagem

5.4. Preparação das Soluções

As soluções contendo L-arginina (Sigma) e L-histidina (VETEC) eram preparadas diariamente, minutos antes de sua administração. Pesadas em balança analítica Bosch, Modelo S-2000, com capacidade máxima de 200g e sensibilidade de até 0,1 mg. As quantidades a serem diluídas em água destilada foram estabelecidas para serem aumentadas gradativamente a cada semana.

Tomando como padrão a recomendação de arginina pela AIN-93M (4,5 g de arginina/Kg de dieta) (Reeves et al, 1993), utilizada para manutenção de ratos na fase adulta (com peso médio em torno de 300g), e estimando um consumo diário de 20g de dieta/rato/dia, obtivemos uma média do consumo diário de arginina (em torno de 0,009g ou 90mg) por ratos adultos. Utilizando esta quantidade base de arginina/dia para um rato adulto, com o auxílio de uma regra de três simples foi estimado o consumo de um filhote com 10 g (peso médio do filhote na primeira semana de lactação) e 30 g (peso médio do filhote no início da 3^a semana do aleitamento). Desta maneira, conseguiu-se estimar o consumo médio de arginina, na quantidade de 3 mg/dia no início da vida e 10

mg/dia na terceira semana (período do desmame). Portanto, com o intuito de ofertar uma quantidade adicional de L-arginina nas três semanas do período experimental, foram utilizadas quantidades de 5mg/dia na primeira semana, 10 mg/dia na segunda semana e 20 mg/dia na terceira semana de tratamento, diluídos em 0,5ml, 1,0ml e 1,0ml de água destilada, respectivamente nas três semanas.

Os grupos controle (Água Nutrido e Água Desnutrido) receberam 0,5ml, 1,0ml e 1,0ml de água destilada, respectivamente nas três semanas de tratamento.

Com o intuito de assegurar que as ratas (mães dos filhotes) estariam recebendo uma quantidade de L-arginina, através da LABINA, dentro da recomendação da AIN-93G (6,4g de arginina/Kg de dieta) (Reeves et al, 1993), quantidade suficiente para manter uma mistura aminoacídica equilibrada no leite materno, e para assegurarmos que os filhotes desmamados iriam receber uma quota diária de arginina dentro das recomendações, submetemos a LABINA à análise dos aminoácidos da dieta (aminograma). O aminograma foi realizado pelo Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, e de acordo com o resultado pôde-se verificar que a LABINA oferece uma quantidade média de arginina/Kg da ração (**ANEXO 3**) dentro da recomendação da AIN-93G, tomada como padrão para o crescimento, gravidez e lactação (Reeves et al, 1993).

5.5. Determinação de Peso Corporal

Para estabelecer a evolução ponderal do animal, os pesos foram aferidos aos 7, 14, 21, 30, 60, e 90 dias de vida, no dia do desmame (25º dia de vida) e no dia do

registro da depressão alastrante cortical (90 – 110 dias de vida). Os animais foram pesados na balança eletrônica digital Marte, Modelo 1001 com capacidade para 1610g e sensibilidade de 0,1g.

5.6. Procedimento Cirúrgico

Para realização dos registros eletrofisiológicos, os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com uma solução de uretana a 10 % + cloralose a 0,4 % (no volume de 10 ml/Kg de peso corporal), o que resultou numa dose de 1000mg/Kg de uretana + 40mg/Kg de cloralose. Após a anestesia iniciou-se o procedimento cirúrgico, com traqueostomia, e introdução de uma cânula de polietileno na traquéia. Em seguida, o animal foi colocado em decúbito ventral sobre um aquecedor elétrico a fim de manter a temperatura retal estável durante todo o experimento (37,5°C +/- 1°C), ajustando-se para isto, o aquecedor quando necessário. O animal teve, então, a cabeça fixada à base de um aparelho estereotáxico (modelo “David-Kopf”, USA, Modelo 900), de modo a permitir a incisão da pele na linha média e a remoção do periósteo para exposição do crânio.

Por meio de trepanação foram feitos 3 orifícios, alinhados paralelamente à linha média, ao nível do hemisfério cerebral direito. O primeiro orifício, anterior (de 2 mm de diâmetro), localizado no osso frontal, foi utilizado para estimulação. Os outros dois orifícios, localizados no osso parietal, tinham de 3 a 4 mm de diâmetro e foram destinados à colocação de dois eletrodos através dos quais se realizou o registro eletrofisiológico. Os orifícios foram alinhados no sentido antero-posterior, paralelos à linha média.

5.7. Estimulação Cortical e Registro Eletrofisiológico

Os registros eletrofisiológicos foram feitos utilizando-se eletrodos impolarizáveis, do tipo ‘Ag-AgCl’, construídos da seguinte maneira: em um fio de prata de 3 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro, cuidadosamente limpo e imerso em uma solução de Ringer, promoveu-se, por eletrólise, a formação de uma fina camada de cloreto de prata, mediante a passagem de uma corrente elétrica contínua, cujo valor inicial era de 0,3 mA, sendo aumentada até 0,8 – 1,0 mA, durante 3 a 5 minutos. Após esta “cloretagem”, dois desses fios eram introduzidos em dois pequenos tubos cônicos de plástico, com 5cm de comprimento, abertura superior com 5mm de diâmetro e ponta de 1 mm de diâmetro. Esses tubos eram cheios com solução de Ringer, solidificado pela adição de Agar a 1,0%. Eles foram colados, um ao outro, com cola à base de cianoacrilato, de modo a formarem um par. Cada par, nessas circunstâncias, apresentava distância fixa entre as pontas, de 3 a 4,5 mm. O par de eletrodos assim construído, foi fixado a uma haste de madeira que por sua vez estava conectada a um sistema de alavancas. Este sistema permitia a movimentação dos eletrodos, para cima e para baixo, e era acionado pelo avanço e recuo de um parafuso. Dessa maneira, os eletrodos puderam ser deslocados verticalmente e suas pontas foram postas em contato com a superfície cortical cuidadosamente, a fim de se evitar a pressão excessiva sobre a mesma. Um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi colocado sobre os ossos nasais e serviu de referência comum aos dois eletrodos registradores. O registro foi efetuado em um polígrafo MODELO 7D (Grass Medical Instruments), por um período contínuo de 4 horas. A velocidade de propagação da DA foi calculada com base na distância entre os dois eletrodos registradores e no tempo gasto pela DA para percorrer a distância entre os

mesmos. A cada hora de registro foi calculada a velocidade média da propagação do fenômeno, a partir das DA's (2 a 3) deflagradas em cada hora.

A DA foi provocada por estimulação química, na qual foi utilizada uma pelota de algodão de 1 mm de diâmetro, embebida de uma solução de cloreto de potássio (KCl) a 2%. Esta pelota foi colocada durante 1 minuto sobre a superfície cortical ao nível do orifício frontal. Essa estimulação repetiu-se a cada 20 - 30 minutos durante o registro. Em cada um dos outros dois orifícios foram registrados, simultaneamente, tanto a atividade elétrica cortical espontânea (ECoG) quanto a variação lenta de voltagem (VLV), que acompanham a DA.

5.8. Peso do Encéfalo

O peso do encéfalo foi determinado ao final dos registros, após os animais serem perfundidos com solução salina seguida de formaldeído a 4%. Os seus encéfalos eram retirados após o neuro-eixo ser seccionado transversalmente em dois níveis: caudalmente, ao nível da borda inferior do cerebelo, incluindo-o; rostralmente, no limite entre os pólos frontais e os bulbos olfatórios, excluindo-se esses últimos. Após a retirada, os encéfalos foram pesados imediatamente em balança analítica (modelo Bosh, S-2000, com sensibilidade até 0,1mg), a fim de se obter o peso do encéfalo.

5.9. Análise Estatística

Para analisar os dados das velocidades de propagação da DA, dos pesos corporais e encefálicos foi empregada a Análise de Variância (ANOVA). As comparações em que a ANOVA apontou diferenças significantes foram submetidas ao teste para comparação múltipla de Tukey, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Foram aceitos como significantes os valores para os quais $p = 0,05$.

6 Resultados

6.1. Pesos Corporal e Encefálico

Os pesos corporais dos animais tratados cronicamente durante o aleitamento materno com os aminoácidos L-arginina (ARG-N₆) e L-histidina (HIS-N₆) não se apresentaram diferentes dos seus respectivos controles (tratados com água destilada – C-N₆). Contudo, aos 90 dias de vida, os ratos que receberam ARG (ARG-N₆) apresentaram pesos corporais superiores aos tratados com HIS (HIS-N₆), sendo as diferenças estatisticamente significantes.

Quanto ao efeito da manipulação do estado nutricional, os pesos corporais variaram de forma inversamente proporcional ao tamanho da ninhada. Os animais amamentados em ninhadas com 12 filhotes (N₁₂ - animais desnutridos) apresentaram pesos corporais inferiores àqueles amamentados em ninhadas com 6 filhotes (N₆ - animais normonutridos), tanto para os animais tratados com o aminoácido ARG, como para os animais controle. Essa diferença foi persistente até o desmame, porém no 30º dia de vida os animais das ninhadas menores e tratados com ARG (ARG-N₆) ainda apresentavam pesos corporais significativamente maiores do que os animais N₁₂ e submetidos ao mesmo tratamento. Os pesos médios, com as indicações das diferenças significantes, estão apresentados na **TABELA 1** e ilustrados graficamente na **FIGURA 4.**

TABELA 1

Evolução ponderal de ratos amamentados em ninhadas de 6 e 12 filhotes por mãe (respectivamente, N₆ - normonutridos e N₁₂-desnutridos), no início da vida, e submetidos ao tratamento crônico durante o aleitamento com uma solução aquosa contendo o aminoácido L-arginina (grupos **ARG-N₆** e **ARG-N₁₂**), L-Histidina (grupo **HIS-N₆**) ou Água (grupos **C-N₆** e **C-N₁₂**), durante 21 dias, por sonda orogástrica. Os valores representam a média \pm desvio-padrão, e o número de animais está indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores significativamente diferentes dos respectivos valores marcados com a mesma letra, na coluna da esquerda. Para análise estatística foi utilizada ANOVA, seguida do teste de Tukey e foram considerados os valores estatisticamente significantes quando $p = 0,05$.

Grupos	Pesos Corporais (g)						
	7º dia	14º dia	21º dia	25º dia	30º dia	60º dia	90º dia
ARG -N₆	18,8 \pm 2,0	34,1 \pm 3,4	52,0 \pm 5,1	69,2 \pm 7,0	93,2 \pm 12,1	272,6 \pm 29,7	366,3 \pm 41,3^c
a	(16)	(18)	(18)	(15)	(18)	(18)	(18)
C-N₆	17,6 \pm 2,7	32,9 \pm 3,6	50,1 \pm 5,5	65,3 \pm 8,1	88,2 \pm 11,1	256,4 \pm 27,2	339,3 \pm 46,8
b	(20)	(22)	(22)	(18)	(22)	(22)	(22)
HIS-N₆	17,7 \pm 1,9	31,9 \pm 3,1	50,9 \pm 5,3	66,2 \pm 6,6	89,4 \pm 8,1	249,2 \pm 35,7	328,9 \pm 41,7
c	(18)	(18)	(18)	(18)	(18)	(18)	(18)
ARG-N₁₂	15,3 \pm 2,1^a	25,7 \pm 3,5^a	41,1 \pm 5,7^a	54,8 \pm 4,6^a	81,7 \pm 12,2^a	250,5 \pm 25,3	338,5 \pm 30,0
d	(17)	(17)	(17)	(13)	(17)	(17)	(17)
C-N₁₂	14,3 \pm 2,0^b	25,0 \pm 3,2^b	39,9 \pm 4,4^b	54,5 \pm 4,3^b	79,4 \pm 8,6	237,9 \pm 16,4	326,1 \pm 24,5
e	(19)	(19)	(19)	(16)	(19)	(19)	(19)

EVOLUÇÃO PONDERAL DOS RATOS

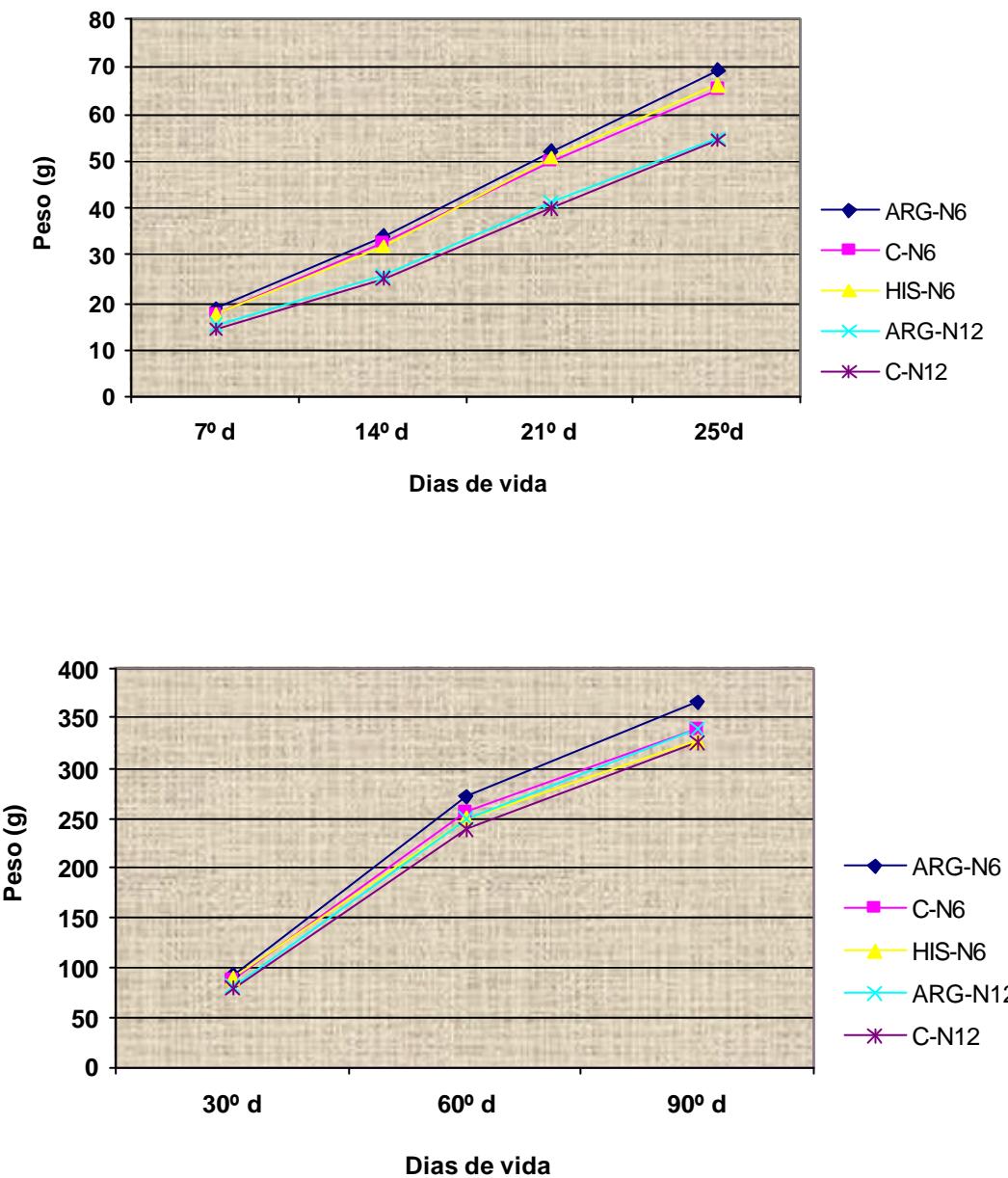


FIGURA 4 – Evolução ponderal de ratos amamentados em ninhadas de 6 e 12 filhotes por mãe (respectivamente, N₆ - normonutridos e N₁₂-desnutridos), no início da vida, e submetidos ao tratamento crônico durante o aleitamento com uma solução aquosa contendo o aminoácido L-arginina (grupos **ARG-N₆** e **ARG-N₁₂**), L-Histidina (grupo **HIS-N₆**) ou Água (grupos **C-N₆** e **C-N₁₂**), durante 21 dias, por sonda orogástrica. Os valores representam a média \pm desvio-padrão. Para análise estatística (ver **TABELA 1**) foi utilizada ANOVA, seguida do teste de Tukey e foram considerados os valores estatisticamente significantes quando $p = 0,05$.

No dia do registro eletrofisiológico, o peso encefálico foi obtido após perfusão do animal. Diferença significativa foi encontrada entre os pesos encefálicos dos animais oriundos da manipulação precoce das ninhadas. Observou-se que os animais amamentados em ninhadas maiores (desnutridos) apresentaram pesos encefálicos reduzidos, quando comparados aos animais que foram amamentados em ninhadas menores (bem nutridos).

Ao analisar as possíveis alterações decorrentes do tratamento experimental com os aminoácidos ARG e HIS, durante o período do aleitamento, observou-se que apenas os animais bem nutridos apresentaram alterações nos pesos encefálicos em decorrência da suplementação precoce destes aminoácidos. Os animais que receberam a infusão oral com o aminoácido HIS (HIS-N₆) apresentaram pesos encefálicos menores em relação aos animais que receberam o aminoácido ARG (ARG-N₆) e em relação aos animais controles (C-N₆).

Ao comparar os pesos encefálicos dos animais oriundos de grandes ninhadas e tratados precocemente com os dois aminoácidos, não houve diferenças significantes. Os valores médios foram semelhantes, não identificando qualquer alteração advinda do tratamento com os aminoácidos durante o período do aleitamento.

No mesmo dia do registro eletrofisiológico (animais com idade média variando entre 92 e 94 dias), os pesos corporais não apresentaram diferença significante em relação à manipulação nutricional imposta no início da vida. Diferenças foram observadas nos animais amamentados em ninhadas menores e suplementados com ARG (ARG-N₆), os quais apresentaram pesos corporais superiores aos seus controles (C-N₆) e

aos suplementados precocemente com HIS (HIS-N₆). Os valores médios referentes aos pesos corporais e encefálicos no dia do registro estão apresentados na **TABELA 2**.

TABELA 2

Pesos corporais e encefálicos (no dia do registro da DA), de ratos amamentados em ninhadas de 6 e 12 filhotes por mãe (respectivamente, N₆ - normonutridos e N₁₂-desnutridos), no início da vida, e submetidos a um dos seguintes tratamentos crônicos durante o aleitamento: solução aquosa contendo o aminoácido L-arginina (grupos **ARG-N₆** e **ARG-N₁₂**) ou L-Histidina (grupo **HIS-N₆**) ou Água (grupos **C-N₆** e **C-N₁₂**), por sonda orogástrica durante 21 dias. Os valores representam a média ± desvio-padrão, e o número de medidas está indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores significativamente diferentes dos respectivos valores marcados com a mesma letra, na coluna da esquerda. Para análise estatística foi utilizada ANOVA, seguida do teste de Tukey e foram considerados os valores estatisticamente significantes quando p = 0,05.

Grupos	Peso Corporal (g)	Peso Encefálico (g)*
ARG -N₆	367,6 ± 40,7 ^{b c}	1,6606 ± 0,072 ^{c d}
a	(19)	(10)
C-N₆	348,6 ± 38,8	1,6915 ± 0,048 ^{c e}
b	(21)	(6)
HIS-N₆	333,1 ± 44,7	1,5328 ± 0,083
c	(18)	(8)
ARG-N₁₂	341,0 ± 30,3	1,5247 ± 0,126
d	(17)	(8)
C-N₁₂	330,2 ± 25,2	1,5108 ± 0,041
e	(19)	(8)

* obtidos após perfusão com salina + formaldeído a 4%.

6.2. Velocidade de Propagação da Depressão Alaстрante

A depressão alastrante cortical, como descrito anteriormente, foi provocada através da aplicação tópica de uma “pelota” de algodão com KCl a 2%, por um minuto, em um ponto da região frontal. A onda da DA se propagava regularmente pelo córtex e era registrada pelos 2 eletrodos localizados posteriormente ao ponto de estímulo. Após a DA ser deflagrada, eram aguardados 20 a 30 minutos até a estimulação seguinte ser realizada. O registro eletrofisiológico durava cerca de 4 horas ininterruptas. A **FIGURA 5** exemplifica os registros eletrofisiológicos da DA nos 5 grupos experimentais estudados neste trabalho.

No grupo amamentado em grandes ninhadas e que recebeu solução controle (C-N₁₂), os valores médios das velocidades de propagação da DA, nas quatro horas de registro, apresentaram-se significantemente elevadas, em comparação com os animais amamentados em ninhadas menores (N₆) e submetidos ao mesmo tratamento (C-N₆).

Nos grupos amamentados em ninhadas menores, os animais tratados com ARG (ARG-N₆) apresentaram velocidades médias da DA superiores aos animais controles (C-N₆) e aos tratados com HIS (HIS-N₆). Entre os grupos desnutridos no aleitamento (ninhadas maiores), não houve diferenças significantes. Os valores médios referentes às velocidades de propagação da depressão alastrante durante as quatro horas de registro estão apresentados na **TABELA 3** e ilustrados graficamente na **FIGURA 6**.

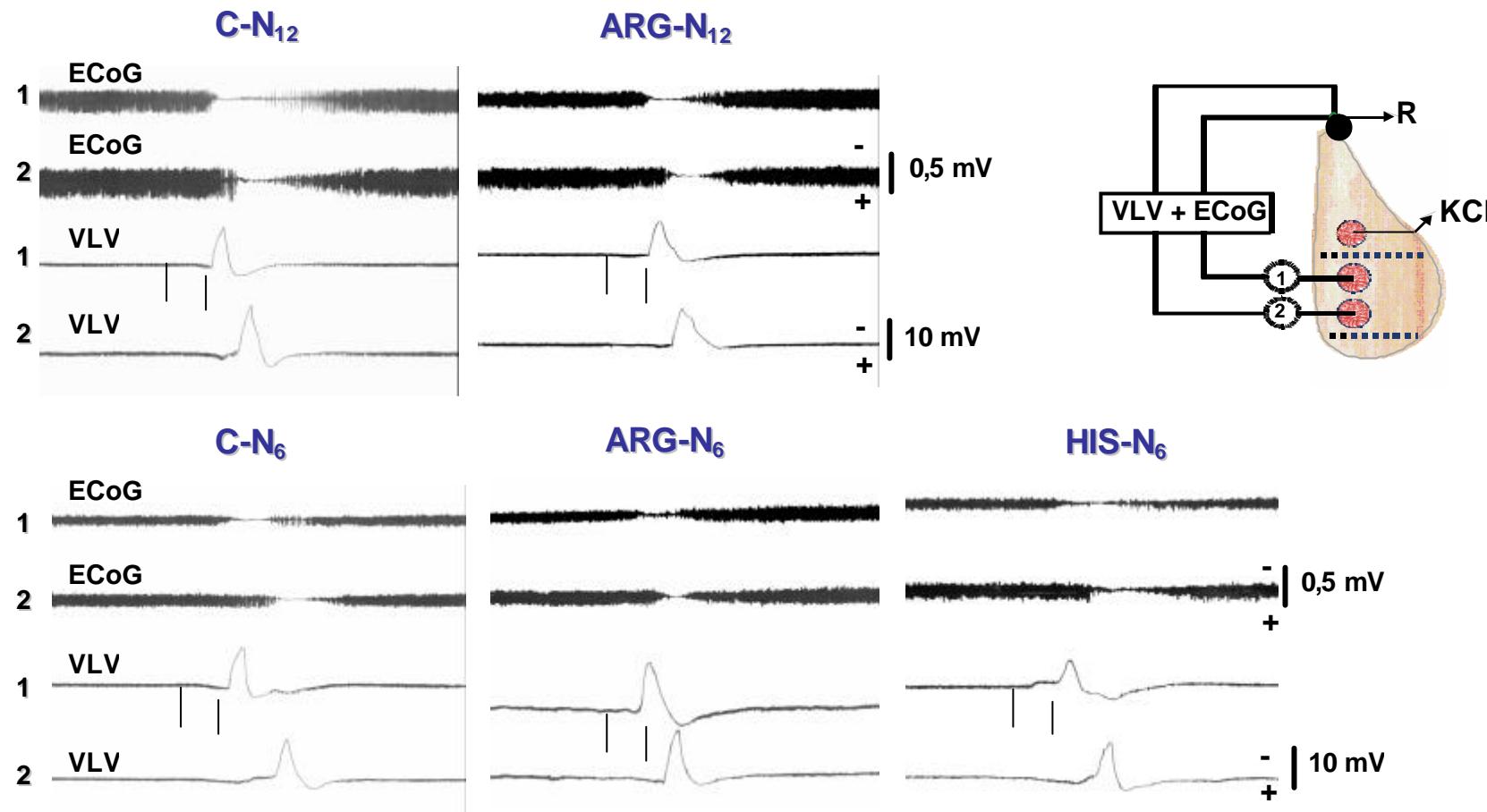


FIGURA 5 – Registros Eletrofisiológicos na região parietal direita do córtex cerebral, em ratos adultos (90-110 dias), amamentados em ninhadas de 6 e 12 filhotes por mãe (respectivamente, N₆ - normonutridos e N₁₂-desnutridos), no início da vida e submetidos durante o aleitamento a um dos seguintes tratamentos: administração orogástrica de solução de L-Arginina (grupos ARG-N₆ e ARG-N₁₂); solução de L-histidina (grupo HIS-N₆) e água destilada (C-N₆ e C-N₁₂). As setas no traçado, indicam o período de estimulação com KCl a 2% (1 minuto), necessário para deflagrar a DA. À esquerda do desenho, os números **1** e **2** indicam os registros obtidos nos pontos marcados com os mesmos números no desenho à direita. Este desenho mostra também esquematicamente a localização do eletrodo de referência (**R**) sobre os ossos nasais e o local de aplicação do **KCl**. A distância entre os eletrodos registradores foi de 4,0 mm nos cinco registros. **ECoG** = eletrocorticograma; **VLV** = variação lenta de voltagem que acompanham a **DA**.

TABELA 3

Velocidades de propagação da depressão alastrante (DA) em ratos adultos (90-110 dias). A condição nutricional foi alterada no aleitamento, pelo método da manipulação de ninhadas (N_6 = ninhadas com 6 filhotes/mãe e N_{12} = ninhadas com 12 filhotes/mãe) e submetidos durante o aleitamento a um dos seguintes tratamentos: administração orogástrica de solução de L-Arginina (grupos **ARG-N₆** e **ARG-N₁₂**); solução de L-histidina (grupo **HIS-N₆**) e água destilada (**C-N₆** e **C-N₁₂**). Os valores representam a média \pm desvio-padrão, com o número de medidas indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores significativamente diferentes dos respectivos valores marcados com a mesma letra, na coluna da esquerda. A análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de Tukey. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Grupos	Velocidade de Propagação da DA (mm/min)			
	1 ^a hora	2 ^a hora	3 ^a hora	4 ^a hora
ARG -N₆	3,97 \pm 0,27^{b c}	4,04 \pm 0,31^{b c}	4,18 \pm 0,31^{b c}	4,17 \pm 0,29^{b c}
a	(19)	(19)	(19)	(19)
C-N₆	3,25 \pm 0,14	3,24 \pm 0,16	3,29 \pm 0,15	3,35 \pm 0,18
b	(21)	(21)	(21)	(20)
HIS-N₆	3,35 \pm 0,21	3,31 \pm 0,18	3,30 \pm 0,17	3,36 \pm 0,22
c	(18)	(18)	(18)	(18)
ARG-N₁₂	4,08 \pm 0,34	4,13 \pm 0,30	4,27 \pm 0,30	4,37 \pm 0,34
d	(17)	(17)	(17)	(17)
C-N₁₂	4,10 \pm 0,14^b	4,11 \pm 0,19^b	4,11 \pm 0,20^b	4,11 \pm 0,18^b
e	(19)	(19)	(19)	(19)

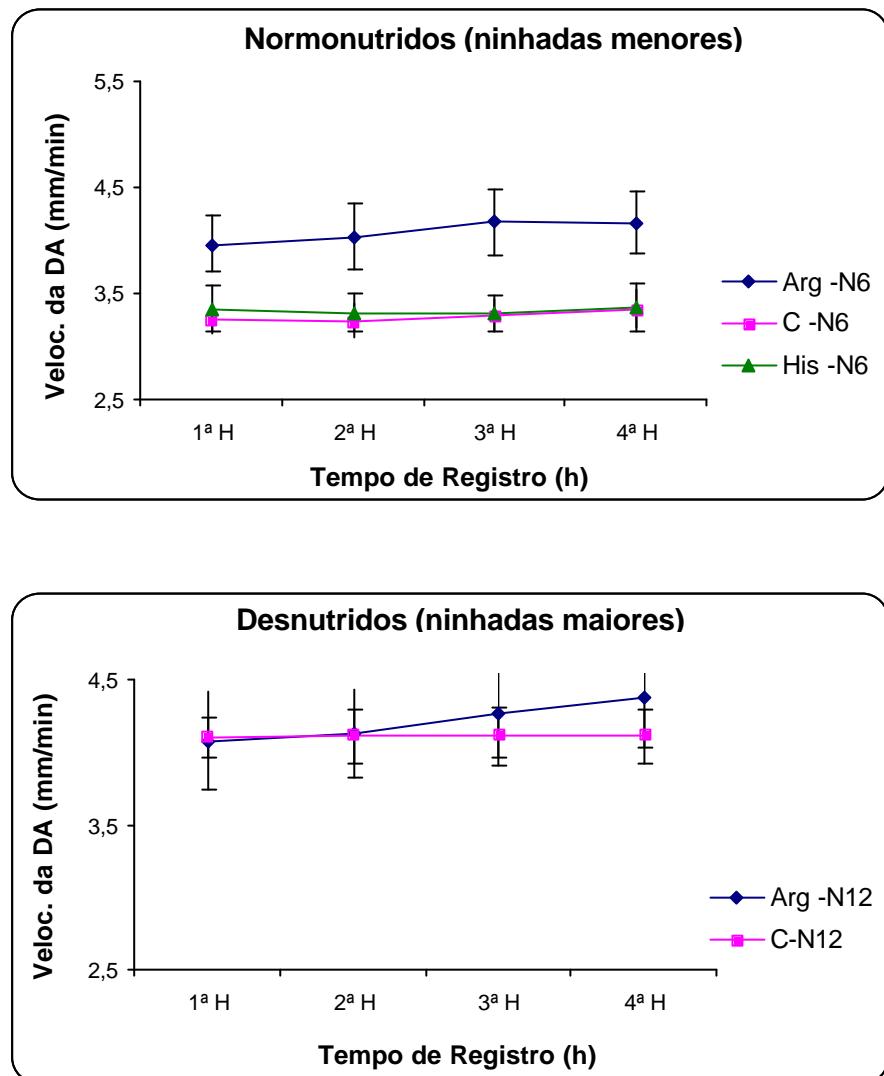


FIGURA 6 – Velocidades médias de propagação da depressão alastrante (DA) no córtex cerebral de ratos adultos (90-110 dias). A condição nutricional foi alterada no aleitamento, pelo método da manipulação de ninhadas (N_6 = ninhadas com 6 filhotes/mãe e N_{12} = ninhadas com 12 filhotes/mãe). Esses filhotes foram submetidos durante o aleitamento a um dos seguintes tratamentos: administração orogástrica de solução de L-Arginina (grupos **ARG- N_6** e **ARG- N_{12}**); solução de L-histidina (grupo **HIS- N_6**) e água destilada (**C- N_6** e **C- N_{12}**). Os dados representam a média do grupo \pm desvio padrão (mm/min), na respectiva hora de registro. Para análise estatística (ver **TABELA 3**) foi utilizado ANOVA seguido de Tukey.

7. Discussão

A arginina é um aminoácido semi-essencial que está envolvido em múltiplas áreas do metabolismo e fisiologia humana (Appleton, 2002). Como principal precursor do óxido nítrico (NO), uma molécula mensageira endógena com ação comprovada na maioria dos tecidos, na qual apresenta função de destaque como modulador da função neuronal no cérebro (Prast e Philippu, 2001), a arginina tem sido alvo de muitas pesquisas nesta área. Achados experimentais têm sugerido que mudanças na via L-arginina/óxido nítrico podem influenciar o comportamento alimentar. Squadrito e colaboradores (1993) estudando um modelo de ratos geneticamente obesos e hiperfágicos, após administração de várias doses do inibidor da sintase do óxido nítrico (NOS), o N^G-nitro-L-arginina (L-NO ARG), observaram uma redução na ingestão alimentar que refletiu na diminuição do ganho de peso corporal destes animais. Estes achados estão em consonância com Morley e Flood (1991) e Squadrito e col. (1994), os quais sugeriram o papel do NO na regulação do apetite em animais famintos, uma vez que a administração de ARG foi capaz de atenuar parcialmente o efeito inibitório provocado pela administração prévia do L-NO ARG.

Prickaerts e col. (1998), ao administrarem um inibidor da NOS (L-NAME), durante o período do desenvolvimento pós-natal, encontraram que o tratamento com o inibidor que começou no dia do nascimento retardou o aumento no peso corporal dos neonatos. Estes autores questionaram os resultados de um trabalho semelhante onde à injeção diária com o inibidor da NOS durante o 8º ao 22º dia de vida não afetou a curva de crescimento dos filhotes. Para Prickaerts e colaboradores (1998), pareceu que a NOS necessitaria ser imediatamente inibida após o nascimento para ser capaz de afetar a taxa

de crescimento de ratos recém nascidos. Transportando as inferências de Prickaerts e col. ao nosso trabalho, uma possível causa que poderia ser apontada por nós para justificar o aumento não significativo, durante o período do tratamento, no peso corporal dos animais que receberam a ARG seria o fato de termos começado o tratamento apenas após uma semana do nascimento, no 7º dia de vida do animal.

Racotta e col (1998), também evidenciaram o efeito hiperfágico do NO em ratos machos previamente submetidos à privação de água e comida e sugeriram que o aumento observado na ingestão alimentar poderia estar relacionado ao aumento da sede induzida pela vasodilatação esplâncnica ou sistêmica secundária a administração do nitroprussiato de sódio (NP), ou possivelmente pela via de produção de NO e sua ação metabólica resultante.

Os possíveis efeitos do óxido nítrico no comportamento alimentar pela ação direta no sistema nervoso central, ou através do sistema nervoso periférico, precisam ser mais bem compreendidos. Evidências experimentais substanciais indicam que o sistema serotoninérgico central é fundamental no controle da ingestão alimentar (Deiró, 1998; Barreto-Medeiros, 1998; Santos, 2001). Squadrito e col (1994) estudaram as relações entre a atividade da NOS e os níveis de serotonina em ratos privados de comida e sugeriram que a privação aumenta a atividade da NOS, que reduz sucessivamente a síntese de serotonina cerebral; por outro lado, a administração de L-NO ARG, inibindo a atividade da NOS, aumentou os níveis de serotonina, ficando evidenciado uma possível função do NO em modular o sistema serotoninérgico. O possível envolvimento da via L-arginina ? óxido nítrico, como também a influência dietética da ARG sobre os

níveis de serotonina cerebral, atuando no comportamento alimentar, precisam ser mais bem estudadas.

No presente estudo, embora as diferenças não tenham sido significantes, pudemos evidenciar um maior ganho de peso nos animais tratados com ARG. De uma certa forma, estes resultados nos levaram a questionar se a via de administração utilizada influenciaria na biodisponibilidade do aminoácido. Flynn et al (2002) acredita que o meio mais efetivo para fornecer arginina exógena aos tecidos extra-hepáticos seria por via intravenosa. Esta forma de administração, segundo esse autor, desviaria o metabolismo gastrintestinal do aminoácido, uma vez que aproximadamente 40% da arginina seria metabolizada e degradada durante a absorção. No entanto, estudos em animais têm mostrado que as administrações orais de ARG, agudas ou crônicas, aumentam a concentração plasmática e melhoram a resposta vascular, provavelmente via formação aumentada do NO (Böger e Bode-Böger, 2001). Em nosso trabalho, utilizamos a via oral para a administração da arginina durante o período de aleitamento dos filhotes por se tratar de uma via fisiológica. A favor da administração oral de arginina, pode-se citar o trabalho de Wu (1998) que refere que o catabolismo desse aminoácido nos enterócitos de animais, durante o período da lactação, é reduzido, devido à atividade desprezível da enzima arginase nessa fase da vida. Isto ajudaria a maximizar a elevação da arginina sanguíneo, após absorção pelo intestino de neonatos, sem que a mesma sofresse extenso catabolismo (Wu, 1998).

Quando os animais se tornaram adultos, aos 90 dias de vida, pudemos observar uma diminuição estatisticamente significante nos pesos corporais dos ratos que receberam o aminoácido L-histidina (HIS), em relação àqueles que receberam L-

arginina. Na literatura científica existem evidências indicando que o metabolismo da HIS é um fator importante na neuroregulação da ingestão alimentar (Mercer et al, 1989; Mercer et al, 1990). A histidina é um aminoácido essencial, precursor do neurotransmissor histamina. Em seu trabalho, Yoshimatsu et al (2002) demonstraram que a administração intra peritoneal (i. p.) de HIS suprimiu a ingestão alimentar de ratos Wistar, implicando que o SNC pode ser um potente alvo da ação do aminoácido na regulação dessa ingestão. Segundo estes pesquisadores, a conversão de HIS a histamina, no hipotálamo, seria responsável para produzir tal efeito supressor. Apesar deste resultado não ter sido observado durante o período de tratamento, especulamos que o tratamento crônico durante o aleitamento poderia alterar alguma via responsável pela ingestão alimentar, com consequências em longo prazo.

Os resultados obtidos no presente trabalho a partir da manipulação nutricional da ninhada, realizada experimentalmente sobre as condições do aleitamento, confirmaram dados já consistentes na literatura. Evidenciou-se que os animais provenientes de ninhadas maiores (N_{12}), tanto os tratados com ARG como os controles, apresentaram uma redução do peso corporal. Esta diferença foi significante até o período do desmame; após este, no 30º dia de vida apenas os animais que receberam a arginina no início da vida continuaram apresentando maior peso corporal no grupo de ninhadas menores (N_6), em relação ao das grandes ninhadas (N_{12}). A partir do desmame, com a retirada da amamentação e adição de alimentação *ad libitum*, não foi possível evidenciar diferença de peso entre os grupos de ninhadas de diferentes tamanhos (N_6 versus N_{12}).

A partir desses resultados, pudemos inferir que a “superpopulação” de filhotes na ninhada, aumentando a competitividade pelo acesso ao leite materno, reduz

quantitativamente e qualitativamente a oferta “per capta” de alimento, resultando em um déficit ponderal de sua prole. Para Fisbeck e Rasmussen (1987) o número de seis filhotes por mãe parece ser o mais fisiologicamente aceito.

Nossos resultados estão em acordo com Rocha-de-Melo (2001) e Santos-Monteiro (2002), cujos resultados revelaram também, redução de peso corporal nos filhotes amamentados em grandes ninhadas (12 filhotes). Em nosso estudo, estas diferenças foram significantes para os animais controles até o desmame e para os animais que receberam a ARG, até o 30º dia de vida. Isto poderia ser esperado, uma vez que o desmame foi realizado apenas no 25º dia de vida e o tratamento experimental com o aminoácido perdurou até o 28º. Entretanto, a redução do peso corporal desapareceu quando os animais atingiram a idade adulta. Com isto pudemos comprovar que o peso corporal foi recuperado em consequência de uma oferta adequada de alimentação, oferecida após o desmame. Apesar da “realimentação” (maior oferta de alimentação após o desmame) ter sido capaz de recuperar o peso corporal desses ratos desnutridos, carências nutricionais precoces são suficientes para produzir seqüelas, muitas vezes permanentes (Smart et al, 1973).

Um outro modelo experimentalmente seguro em provocar redução no peso corporal dos filhotes é a manipulação nutricional com a dieta básica regional (DBR), imposta às ratas durante o período do aleitamento (Rocha-de-Melo, 1997). Utilizando este método, Santos (2001) observou que no grupo desnutrido durante o aleitamento, a redução do peso corporal também desapareceu quando estes animais atingiram a idade adulta; indicando que o peso corporal afetado pela desnutrição durante o aleitamento pôde se recuperar quando uma intervenção alimentar passou a ser oferecida, fazendo

com que o peso corporal desses ratos adultos apresentassem valores semelhantes aos dos animais bem nutridos.

Cambräia e colaboradores (2001), ao estudar o comportamento alimentar de ratos desnutridos durante a lactação observaram que aqueles animais que não experienciaram desnutrição no seu período de crescimento precoce, não apresentaram a mesma eficiência alimentar como ocorreu com os ratos desnutridos durante o período de recuperação. Isto demonstra uma certa resposta adaptativa do organismo ao tentar se recuperar do insulto sofrido, em uma maior velocidade e no menor tempo.

Engelbregt e colaboradores (2001), utilizando manipulação nutricional de 20 filhotes por mãe, estudaram a restrição alimentar precoce sobre a composição corporal desses ratos, no início da puberdade (40 dias de vida). Diferente dos nossos achados, o peso corporal dos ratos precocemente desnutridos foi显著mente menor do que o de seus controles. Isto poderia ser devido ao fato do autor ter provocado um grau severo e duradouro de privação alimentar, o que levaria a um déficit ponderal importante, e possivelmente com recuperação mais lenta.

Nossos resultados podem ser apoiados nas inferências de Farias (2002). Segundo este autor, durante a interrupção ou diminuição da velocidade de crescimento linear, uma vez retirada a causa de agressão ou ofertado o fator carente, o crescimento retoma seu ritmo anterior, como se a agressão ou falta do fator não tivesse ocorrido. É o que ocorre por ocasião do rápido ganho de peso corporal, e também do aumento de crescimento estatural, logo após a recuperação nutricional que segue à desnutrição (Farias, 2002).

Tal acontecimento não ocorre com o cérebro. Uma vez que o período de crescimento cerebral é cuidadosamente seletivo, sendo necessário apenas retardar a taxa de crescimento corporal em direção aos limites mínimos da escala normal para que mudanças permanentes se estabeleçam (Dobbing e Smart, 1974). Há um consenso generalizado de que o cérebro do adulto é bastante protegido dos efeitos da desnutrição. Todavia, durante certos períodos vulneráveis do desenvolvimento cerebral, pequenas carências nutricionais são suficientes para produzir deficiências no SNC as quais poderão tornar-se permanentes (Smart et al, 1973; Peeling e Smart, 1994). Dependendo da intensidade, período e duração da desnutrição, não só o peso corporal é afetado, mas o peso encefálico pode também ser reduzido (Rocha-de-Melo e Guedes, 1997).

A potencialidade dos efeitos prejudiciais da desnutrição sobre as alterações em estruturas cerebrais já foi relatada em muitos estudos. Claramente, o argumento mais convincentemente sustentado sobre esta potencialidade foi aquele de que a desnutrição imposta no início da vida não só reduz o tamanho do cérebro, mas o deixa permanentemente em menor tamanho (Levitsky e Strupp, 1995).

O que tem se tornado um consenso na literatura científica é o fato da desnutrição precoce afetar a proliferação celular, predominantemente glial, bem como o processo de mielinização. A carência nutricional também é responsável pela diminuição na concentração de DNA, menor quantidade de lipídeos cerebrais e pela atividade alterada de enzimas cerebrais (Dobbing e Smart, 1974). Essas alterações culminam com uma diminuição do peso encefálico, especialmente em estruturas como cerebelo, hipocampo e córtex cerebral, o que indica que elas são mais sensíveis a insultos nutricionais durante a fase de crescimento rápido (Fuller e Wiggins, 1984).

Em nossos resultados tais efeitos foram observados nos ratos adultos que sofreram manipulação precoce do seu estado nutricional, ao serem amamentados em ninhadas maiores (N_{12}). Os seus pesos encefálicos foram significativamente menores, quando comparados aos grupos amamentados em ninhadas menores (N_6). Diversos achados estão em consonância com esses nossos resultados. Em trabalhos anteriores, realizados em nosso laboratório, animais desnutridos durante o aleitamento, pela técnica das grandes ninhadas, apresentaram quando adultos pesos cerebrais menores do que os de animais amamentados em ninhadas menores (Rocha-de-Melo, 2001; Santos Monteiro, 2002; Araújo, 2003). Na desnutrição experimental originada pelo uso precoce da DBR, um efeito duradouro do déficit ponderal encefálico também foi observado (Santos, 2001).

Semelhante aos resultados dos pesos corporais dos ratos, discutidos anteriormente, os pesos encefálicos dos animais amamentados em ninhadas menores e tratados sistemicamente com os aminoácidos ARG e HIS, apresentaram respectivamente, maiores e menores pesos encefálicos, quando comparados aos animais controles. Durante a fase de crescimento rápido cerebral, o tratamento com os aminoácidos foi capaz de provocar mudanças ponderais persistentes nos cérebros de tais animais. Este fato não foi evidenciado naqueles animais que sofreram certo grau de restrição alimentar durante o aleitamento, quando amamentados em grandes ninhadas (grupos N_{12}). Essa ausência de efeito entre os desnutridos permite-nos especular sobre duas possíveis hipóteses: ou que o tratamento com esse aminoácido poderia ter sido utilizado para suprir alguma necessidade metabólica importante, ou a deficiência nutricional os tornou hiporesponsivos ao tratamento.

Em relação aos efeitos sobre a DA, nossos resultados evidenciaram que a manipulação da ninhada, aumentando o número de 6 para 12 filhotes por mãe, tornou o córtex cerebral mais sensível ao fenômeno. Neste caso pudemos observar o aumento da velocidade de propagação da DA, em relação aos grupos em que o número de filhotes amamentados permaneceu o padrão (6 filhotes por mãe). Tais efeitos foram observados na idade adulta, tendo os animais sido manipulados precocemente. Os dados obtidos em nosso trabalho comprovam mais uma vez que a alteração do estado nutricional provocado pela manipulação precoce da ninhada pode ser capaz de alterar parâmetros eletrofisiológicos de uma forma irreversível, como o fenômeno da DA, por exemplo. Através de tal análise observamos que aspectos relacionados à função neural não puderam ser revertidos mesmo após os animais terem recuperado o déficit ponderal adquirido durante o aleitamento.

Como comentado na introdução, no início da vida o sistema nervoso atravessa um período crítico de crescimento rápido. Esse período, que varia de espécie para espécie, possui uma janela temporal fechada (pré-determinada). Nessa fase o cérebro encontra-se mais vulnerável a fatores externos, dentre os quais a nutrição exerce papel de destaque. Episódios de desnutrição durante este período podem afetar processos importantes no desenvolvimento neural como neurogênese, gliogênese, diferenciação e migração celular, sinaptogênese e mielinização. Ademais, a maturação neural será definida nesta fase, permanecendo até a idade adulta (Morgane et al, 1993; Dobbing e Smart, 1974).

A abordagem de se utilizar à depressão alastrante cortical com o intuito de se compreender até que ponto a manipulação nutricional precoce afetaria aspectos

morofuncionais cerebrais tem sido utilizada há muito tempo (Guedes et al, 2004). No ano de 1977, De Luca e colaboradores investigaram os efeitos tardios da desnutrição precoce sobre o fenômeno da DA. Tais autores discutiram que as altas velocidades de propagação da DA no córtex de ratos desnutridos poderia ser explicada pela reduzida mielinização o que representaria diminuição da quantidade de uma estrutura (a mielina) que se contraporia à deflagração e propagação da DA.

Outro fator importante que parece contribuir na determinação da susceptibilidade cortical ao fenômeno da DA é o fato de que a desnutrição imposta no período crítico do desenvolvimento cerebral traz como principal consequência o comprometimento da multiplicação das células gliais (Guedes e Cavalheiro, 1997). Como comentado anteriormente, a desnutrição afeta o crescimento glial e é responsável também pela menor quantidade de DNA além de alterar as enzimas cerebrais tornando o cérebro mais vulnerável a insultos nutricionais durante a fase de crescimento (Dobbing e Smart, 1974; Fuller e Wiggins, 1984). Assim, pelo fato da glia desempenhar importante papel na regulação do K^+ e pH extracelular, bem como na transmissão sináptica, um prejuízo na formação glial acarretaria um aumento do risco neuronal, deixando o tecido cerebral mais suscetível a depressão alastrante (Largo et al, 1997).

Nossos resultados estão em consonância com trabalhos experimentais já realizados em nosso laboratório (LAFINNT), os quais utilizaram manipulação do tamanho da ninhada, analisando sua repercussão sobre a DA, tanto em ratos jovens, quanto em ratos adultos. Estes trabalhos concluíram que a modificação da condição nutricional durante o aleitamento, persiste até a idade adulta, mesmo após os animais

terem retornado a alimentação adequada (Rocha-de-Melo, 2001; Santos-Monterio, 2002; Araújo, 2003).

O aumento da velocidade da DA em decorrência da desnutrição, utilizando-se para isto a DBR, também foi evidenciado em estudos recentes (Rocha-de-Melo e Guedes, 1997; Guedes et al, 2002). Esses achados acima citados reforçam dados já consistentes de que uma nutrição adequada em qualidade e quantidade, durante o período crítico do desenvolvimento cerebral, é fundamental para o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso, e que déficits nutricionais podem causar alterações persistentes no tecido neural.

As investigações do presente trabalho foram traçadas no sentido de se estudar em ratos adultos os efeitos da administração crônica de L-arginina, combinada a manipulação do estado nutricional durante o período do aleitamento, na velocidade da depressão alastrante cortical (DA). Os resultados mostraram que o tratamento precoce com ARG aumentou a susceptibilidade cortical à DA em ratos adultos, ao julgar pelas altas velocidades, sugerindo um papel do aminoácido na DA. O déficit nutricional induzido pelo aumento do tamanho da ninhada (grupos N₁₂) alterou o efeito da ARG sobre a DA, uma vez que este aminoácido teve efeito apenas nos animais com condição nutricional normal (manipulados em ninhadas menores).

Em relação à hiporesponsividade do tratamento com ARG sobre a DA, nos ratos desnutridos, nossos dados confirmam relatos prévios a respeito dos efeitos da desnutrição em alterar a capacidade da resposta cerebral a alguns agentes facilitadores ou inibidores da DA (Guedes et al, 1996). Resultados anteriores têm mostrado que a

desnutrição precoce reduz o efeito facilitatório do agonista do ácido amino butírico (GABA), o diazepam (Guedes et al, 1992), bem como o efeito inibitório da glicose (Ximenes-da-Silva, 1991; Costa-Cruz, 2001), sobre a DA. Estas observações, feitas em animais desnutridos, levaram à conclusão de que este insulto nutricional diminui a habilidade do cérebro em reagir na presença de algumas, mas não todas as substâncias. De fato, outras substâncias, como por exemplo, o inibidor seletivo da recaptação da serotonina, o citalopram, exerce a mesma ação antagônica sobre a DA, tanto em ratos normais, quanto naqueles precocemente desnutridos (Guedes et al, 2002).

Os efeitos da manipulação do óxido nítrico sobre a DA têm sido extensivamente documentados na literatura científica, e a sua grande maioria sugere que alterações agudas na sinalização do óxido nítrico (principal produto do metabolismo deste aminoácido) estão envolvidas na propagação da depressão alastrante cortical. Os diversos achados da literatura em respeito a esta estreita relação destacam que: (i) durante a DA há formação aumentada do NO (Read et al, 1997); (ii) a dilatação inicial que ocorre durante a DA é mediada, pelo menos em parte, pelo NO (Goadsby et al, 1992; Collonna et al, 1994; Wahl et al, 1994; Shimizu et al, 2002); (iii) doadores do NO reduzem a velocidade da DA em preparações de retina (Ulmer et al, 1995) e (iv) o inibidor da sintase do NO (NOS) é o maior responsável por aumentar marcadamente a recuperação da homeostase iônica da onda de DA (Obrenovitch et al, 2002; Wang et al, 2003). No entanto, não encontramos estudos relacionando a administração orogástrica de ARG e as características da DA.

Nossos resultados representam o efeito tardio do tratamento crônico com a ARG durante o período de crescimento rápido cerebral (lactação). Portanto é difícil compará-

los com aqueles dos estudos anteriormente citados onde a manipulação com o aminoácido ARG, ou com doadores não enzimáticos do NO, ou com inibidores da NOS foi realizada agudamente e por via de administração tópica, intracerebroventricular ou intraperitoneal. Dessa maneira, os resultados aqui obtidos permitem-nos apenas fazer conjecturas e propor hipóteses a respeito das possíveis alterações da susceptibilidade cortical à DA mediadas pela manipulação do sistema do óxido nítrico.

Como comentado (na introdução), dentre as inúmeras funções do NO no sistema nervoso, a participação deste mensageiro celular na liberação de neurotransmissores como acetilcolina, catecolaminas, histamina, serotonina e aminoácidos excitatórios e inibitórios tem sido alvo de muitas pesquisas (ver em revisão de Prast e Pullippu, 2001). Alterações em certos sistemas de neurotransmissores são conhecidos por interferir na propagação da DA e alguns trabalhos realizados em nosso laboratório abordaram esta questão. Guedes et al (1988) demonstraram o papel dos aminoácidos excitatórios na DA, onde a aplicação tópica de NMDA ou ácido kaínico, em concentrações elevadas deflagraram a DA, ao passo de que baixas concentrações antagonizaram a propagação da DA. Anos mais tarde Guedes et al (1992) testaram em ratos nutridos os efeitos dos agonistas e antagonistas GABAérgicos sobre a DA. A injeção intravenosa aguda (durante o registro) do agonista Diazepam, aumentou, e a dos antagonistas Picrotoxina e Bicuculina reduziu a velocidade de propagação da DA. Nos ratos desnutridos estes efeitos não foram encontrados. A partir dos resultados obtidos em nosso trabalho, podemos especular que administração precoce e crônica de ARG possivelmente tenha interferido na via “NO x neurotransmissores”, provocando alterações duradouras, modificando a susceptibilidade cortical à DA. Todavia, apenas investigações futuras (utilizando outras dosagens de ARG e outras formas de administração, e/ou

administrando em outro grupo um inibidor da NOS) nos fornecerão maiores subsídios para tentarmos compreender melhor tais alterações.

Um outro aspecto citado na introdução é a respeito do papel da arginina na função neuroendócrina, responsável pela estimulação dos hormônios pancreáticos em humanos (Palmer, 1975). Shankar e colaboradores (1998) comprovaram estudos anteriores ao demonstrar em ratos Sprague Dawley adultos, que a inibição aguda da NOS no SNC induziu hiperglicemia, e deficiência na secreção de insulina.

Estudos realizados em nosso laboratório evidenciaram que hiperglicemia, aguda e crônica, diminuem a velocidade da DA, enquanto que a hipoglicemia aumenta a velocidade deste fenômeno (Ximenes-da-Silva e Guedes, 1991; Costa-Cruz e Guedes, 2001). Consideramos que será importante investigar em trabalhos futuros se a administração crônica de ARG durante o período crítico será capaz de alterar o metabolismo glicêmico via modificação na liberação de insulina, o que poderia aumentar a susceptibilidade cortical à DA.

A ARG é um aminoácido conhecido pelas inúmeras funções metabólicas que desempenha no organismo. O NO é responsável por grande parte dessas funções, dentre elas a de modulador universal da função neuronal ao nível do SNC. Em resumo, nosso trabalho se refere ao tratamento precoce com esse aminoácido, associado à manipulação do estado nutricional e sua repercussão, em longo prazo, sobre a excitabilidade neuronal. Isto é apenas o início de nossa contribuição no sentido de esclarecer o papel deste aminoácido na susceptibilidade cortical ao fenômeno da DA.

8. Conclusões

Com base nos resultados deste trabalho, são apresentadas as seguintes conclusões:

- 1) a manipulação do tamanho da ninhada durante a lactação foi suficiente para alterar o desenvolvimento corporal e encefálico dos ratos, a julgar pelos seus pesos;
- 2) a susceptibilidade cortical dos filhotes, quando adultos, à depressão alastrante variou de forma diretamente proporcional ao tamanho das ninhadas;
- 3) Nos animais adultos provenientes de ninhadas menores (grupos N), o tratamento crônico com ARG, durante o aleitamento, aumentou a susceptibilidade cortical a DA, a julgar pelo aumento de suas velocidades, sugerindo um papel para este aminoácido na DA;
- 4) o déficit nutricional induzido pelo aumento do tamanho das ninhadas aboliu o efeito da arginina sobre a DA, sugerindo que esse efeito é dependente do estado nutricional durante o aleitamento;
- 5) o tratamento com HIS, como controle da ARG, não reproduziu o efeito de tal aminoácido (ARG) sobre a DA, sugerindo que o papel da ARG sobre a DA não dependeu do aumento da quantidade de nitrogênio oferecido a partir deste aminoácido.

9. Perspectivas

Os resultados deste trabalho, referentes à associação entre as condições do aleitamento e tratamento crônico com a ARG, nos permitem sugerir as seguintes perspectivas, visando dar continuidade ao estudo deste tema:

- 1) investigar o efeito da ARG sobre a DA de ratos manipulados em ninhadas muito reduzidas;
- 2) investigar o efeito agudo e/ou em curto prazo, da administração da ARG sobre a DA cortical;
- 3) utilizando a mesma metodologia, investigar a susceptibilidade cortical a DA em diferentes fases da vida, como por exemplo, logo após o desmame e na idade jovem;
- 4) utilizar várias dosagens do aminoácido (curva “dose x resposta”) e distintas vias de administração (intraperitoneal e intravenosa) a fim de se comparar se há diferença entre eles quanto ao seu efeito sobre a DA;
- 5) verificar níveis glicêmicos durante o tratamento com a ARG e também no dia do registro eletrofisiológico.

10. Referências Bibliográficas

ALBRECHT, E. W. J. A.; GOOR, H. U.; OOSTEN, A. S.; STEGEMAN, C. A. Long-term dietary L-arginine supplementation attenuates proteinuria and focal glomerulosclerosis in experimental chronic renal transplant failure. *Nitric Oxide*, v. 8, n. 1, p. 53-58, 2003.

ANDRADE, A. F. D.; GUEDES, R. C. A.; TEODÓSIO, N. R. Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary supplementation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 23, p. 889-893, 1990.

APPLETON, J. Arginine: clinical potential of a semi-essential amino acid. *Alternative Medicine Review*, v. 7, n. 6, p. 512-522, 2002.

ARAÚJO, M. G. R. Nutrição, atividade física e desenvolvimento cerebral; efeitos sobre a depressão alastrante cortical em ratos. Recife: Tese (Doutorado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 69 p., 2003.

BÖGER, R. H.; BODE-BÖGER, S. M. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annals Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 41, p. 79-99, 2001.

BARRETO-MEDEIROS, J. M. Agressão intraespecífica e consumo alimentar em ratos adultos: efeitos da desnutrição pregressa e/ou de inibidor seletivo da recaptação de serotonina. Recife: Dissertação (Mestrado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 124 p., 1998.

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

BRENMAN, J. E.; BREDT, D. S. Synaptic signaling by nitric oxide. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 7, p. 374-378, 1997.

CAMBRAIA, R. P. B.; VANNUCCHI, H.; ALMEIDA, S. S.; DE-OLIVEIRA, L. M. Effects of malnutrition during early lactation on development and feeding behavior under the self-selection paradigm. *Nutrition*, v. 17, p. 455-461, 2001.

CAVALCANTI, ML.F. Os cereais e a alimentação infantil. *Temas de Pediatria*. Nestlé-Serviço de Informação Científica, n. 60, p. 3-11, 1995.

CHENG, A.; WANG, S.; CAI, J.; RAO, M. S.; MATTSON, M. P. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Developmental Biology*, v. 258, p. 319-333, 2003.

COLLONNA, D. M.; MENG, W.; DEAL, D. D.; BUSIJA, D. W. Nitric oxide promotes arteriolar dilatation during cortical spreading depression in rabbits. *Stroke*, v. 25, n. 12, p. 2463-2470, 1994.

CONTESTABILE, A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Research Reviews*, v. 32, p. 476-509, 2000.

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. *Annals of Review Medicine*, v. 47, p. 219-227, 1996a.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide neurotoxicity. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 10, p. 179-190, 1996b.

DE LA MONTE, S. M.; JEAN-DANIEL, C.; VON DEM BUSSCHE, A.; SOHINI, A.; STEPHANIE, L. A.; STEPHAN, P. J.; KENNETH, D. B. Nitric oxide synthases-3 overexpression causes apoptosis and impairs neuronal mitochondrial function: relevance to Alzheimer's-type neurodegeneration. *Lab Invest*, v. 83, n. 2, p.287-298, 2003.

DE LUCA, B.; CIOFFI, L. A.; BURES, J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. *Activitas Nervosa Superior*, v. 12, n. 2, p. 130-131, 1977.

DECKEL, A. W. Nitric oxide and nitric oxide synthase in Huntington's disease. *Journal of Neuroscience Research*, v. 64, n. 2, p. 99-107, 2001.

DEIRÓ, T. C. B. J. Desenvolvimento somático e sensório motor e padrão adulto do consumo alimentar, em ratos: efeitos do tratamento neonatal com inibidor da recaptação

da serotonina durante o período de crescimento rápido do encéfalo. Recife: Dissertação (Mestrado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 101 p., 1998.

DOBBING, J. *Vulnerable periods in developing brain*. In: DAVISON, A. N.; DOBBING, J. (Eds.) *Applied Neurochemistry*. Oxford: Blackwell, v. 287-316, 1968.

DOBBING, J.; SMART, J. L. Vulnerability of developing brain and behavior. *British Medical Bulletin*, v. 30, n. 2, p. 164-168, 1974.

EBADI, M.; SHARMA, S. K. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, v. 5, n. 3, p. 319-335, 2003.

ENGELBREGT, M. T. J.; MIRJAM, M. POPP-SNIJDERS, C. P. ; LIPS, P.; HENRIETTE, A. D. W. Body mass index, body composition, and leptin at onset of puberty in male and female rats after intrauterine growth retardation and after early postnatal food restriction. *Pediatric Research*, v. 50, n. 4, p. 474-478, 2001.

FAO/WHO/UNU. Energy and protein requirements. *Report of a joint FAO/WHO/UNU ad hoc expert consultation*. WHO Technical Report Series, n. 724, p. 1-206, 1985.

FARACI, F. M. Regulation of cerebral circulation by nitric oxide. *Methods in Neuroscience*, v. 31, p. 264-272, 1996.

FARIAS, E. S. Estado nutricional, crescimento físico e atividade física de escolares de 7 a 10 anos de idade da rede municipal de ensino de Porto Velho, RO. Florianópolis: Dissertação (Mestrado), Programa de Pós Graduação em Educação Física, Universidade Federal de Santa Catarina, p.117, 2002.

FERNSTROM, J. D. Can nutrient supplements modify brain function? *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 71, p. 1669S-1735S (suppl.), 2000.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido Nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista Associados Med Bras*, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FISHBECK, K. L.; RAMUSSEN, K. M. Effect of repeated cycles on maternal nutritional, status, lactational performance and litter growth in ad libtum-fed and chronically food-restricted rats. *Journal of Nutrition*, v. 117, p. 1967-1975, 1987.

FISHER, R. B. *Protein metabolism*. London: Metheren, 1954.

FLYNN, N. E.; MEININGER, C.J.; HAYNES, T. E.; WU, G. The metabolic basis of arginina nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother*, v. 56, p. 427-438, 2002.

FULLER, G. N.; WIGGINS, R. C. Differential growth recovery within the brains of postnatally undernourished rats. *Developmental Brain Research*, v. 15, p. 280-282, 1984.

FURCHGOTT, R. F.; CHERRY, P. D.; ZAWAKZKI, J. V.; JOTHIANANDAN, D. Endothelial cells as mediator of vasodilatation of arteries. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 53, p. 557-573, 1984.

GALLY, J. A.; MONTAGUE, P. R.; REEKE, G. N.; EDELMAN, G. M. The NO hypothesis: Possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci*, v. 87, p. 3547-3551, 1990.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *TINS*, v. 14, n. 2, p. 60-67, 1991.

GIBBS, S. M. Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. *Molecular Neurobiology*, v. 27, n. 2, p. 107-120, 2003.

GOADSBY, P. J.; KAUBE, H.; HOSKIN, K. L. Nitric oxide synthesis couples cerebral blood flow and metabolism. *Brain Research*, v. 595, p. 167-170, 1992.

GORJI, A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Research Reviews*, v. 38, p. 33-60, 2001.

GRANT, M. K. O.; CUADRA, A. E.; EL-FAKAHANY, E. E. Endogenous expression of nNOS protein in several neuronal cell lines. *Life Sciences*, v. 71, p. 813-817, 2002.

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

GUEDES, R. C. A.; AZEREDO, F. A. M.; HICKS, T. P.; CLARKE, R. J.; TASHIRO, T. Opioid mechanisms involved in the slow potential change and neuronal refractoriness during cortical spreading depression. *Experimental Brain Research*, v. 69, p. 113-118, 1987b.

GUEDES, R. C. A.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; COSTA-CRUZ, R. R. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early -malnourished adult rats. *Nutritional Neuroscience*, v. 5, n. 2, p. 115-123, 2002.

GUEDES, R. C. A.; AMORIM, L.F.; MEDEIROS, M. C.; SILVA, A. T.; TEODÓSIO, N. R. Effect of dietary Lithium on cortical spreading depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v, 22, p. 923-925, 1989.

GUEDES, R. C. A.; ANDRADE, A. F. D.; CABRAL-FILHO, J. E. Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein deficiency *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 20, p. 639-642, 1987a.

GUEDES, R. C. A.; ANDRADE, A. F. D.; CAVALHEIRO, E. A. Excitatory amino acids and cortical spreading depression. In: Cavalheiro, E. A.; Leehrman, J.; Turski, L. (eds). *Frontiers in excitatory amino acid research*. Liss, New York, p. 667-670, 1988.

GUEDES, R. C. A.; CAVALHEIRO, E. A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epilepsy Research*, v.27, p. 33-40, 1997.

GUEDES, R. C. A.; FRADE, S. F. Effect ethanol on cortical spreading depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 26, n. 11, p. 1241-1244, 1993.

GUEDES, R. C. A.; PEREIRA-DA-SILVA, M. S. Effect of pré and postnatal propythiouracil administration on propagation cortical spreading depression of adults rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 26, p. 1241-1128, 1993.

GUEDES, R. C. A.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; TEODÓSIO, N. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. *Revista Ciência e Cultura (Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência)*, ano 56, n.1, p. 32-35, 2004.

GUEDES. R. C. A.; CABRAL-FILHO, J. E.; TEODÓSIO, N. R. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and early malnourished rats. *Experimental Brain Research*, n. 23, p. 17-26, 1992.

GUEDES. R. C. A.; MONTEIRO, J. S. M.; TEODÓSIO, N. R. Malnutrition and brain function: experimental studies using the phenomenon of cortical spreading depression *Revista Brasileira de Biologia*, v. 56, Supl. 1, p. 293-301, 1996.

HARE, J. M.; COLUCCI, W. S. Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. *Prog Cardiovascular Disease*, v. 38, p. 155-166, 1995.

HU, J.; EL-FAKAHANY, E. E. Intricate regulation of nitric oxide synthesis in neurons. *Cell Signal*, v. 8, n. 3, p. 185-189, 1996.

KAPAZI, I. A. M. Suplementação Alimentar. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO: HISTÓRIA E ARTE, 2000, Florianópolis. *Anais ...* Florianópolis: UFSC, 2000. p. 63-66.

KEILHOFF, G.; SIDEL, B.; NOACK, H.; TISCHMEYER, W.; STANEK, D.; WOLF, G. Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development. *Neuroscience*, v. 75, n. 4, p. 1193-1201, 1996.

LARGO, C.; IBARZ, J. M.; HERRERAS, O. effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ. *American Physiological Society*, v 78, p. 295-307, 1997.

LEÃO, A. A. P. Spreading depression. In: PURPURA, D. P.; PENRY, K.; TOWER, D. B.; WOODBURY, D. M.; WALTER, R. D. *Experimental Models of Epilepsy*. New York: raven Press, p. 173-195, 1972.

LEÃO, A. A. P. Further observation, on spreading depression of activity in cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*, v. 10, p. 409-414, 1947.

LEÃO, A. A. P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*, v. 7, p. 359-390, 1944.

LEÃO, A. A. P. The slow voltage variation of spreading depression cortical of activity. *Journal of Neurophysiology*, v. 3, p. 315-321, 1951.

LEVITSKY, D. A; STRUPP, B. J. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *Journal of Nutrition*, v. 125, p. 2212S-2220S (suppl.), 1995.

MARLETTA, M. A.; SPIERING, M. M. Trace elements and nitric oxide function. *Journal of Nutrition*, v. 133, p. 1431S-1433S, 2003.

MARTINEZ, H. Aspectos clínicos e tratamento da má nutrição energético-protéica. *Anais Nestlé*, v. 61, p. 11-18, 2001.

MARTORELL, R. Conseqüências de longo prazo da subnutrição no desenvolvimento físico e mental. *Anais Nestlé*, v. 61, p. 19-30, 2001.

MELO, A. P. R. Restrição nutricional em distintas fases do aleitamento materno e desenvolvimento cerebral da prole, avaliação no rato adulto. Recife, 1994. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, 1994.

MERCER, L. P.; DOODS S. J.; WEBER, M. D.; DIUNN, J. D. Histidine, histamine, and the neuroregulation of food intake: a review and hypothesis. *Nutrition*, v. 6, n. 4, p. 273-277, 1990.

MERCER, L.P.; DOODS, S. J.; SCHWEISTHAL, M. R.; DUNN, J. D. Brain histidine and food intake in rats fed deficient in single amino acids. *Journal Nutrition*, v. 119, p. 66, 1989.

MORGANE, P. J.; AUSTIN- LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAZ-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.

MORGANE, P. J.; MILLER, M. KEMPER, T.; STER, W.; FORBÉS, W.; HALL, R.; BRONZINO, J.; KISSANE, J.; HAWLYREWICZ, E.; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 2, p. 137-230, 1978.

MORLEY, J. E.; FLOOD, J. F. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sciences*, v. 49, p. 707-711, 1991.

OBRENOVITCH, T.; URENJAK, J.; WANG, M. Nitric oxide formation during cortical spreading depression is critical for rapid subsequent recovery of ionic homeostasis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v. 22, p. 680-688, 2002.

OGILVIE, P.; SCHILLING, K.; BILLINGSLEY, M. L.; SCHIMIDT, H. H. Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. *The FASEB Journal*, v. 9, p. 799-806, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. Termologia sobre alimentos e nutrição: definição de alguns termos e expressões de uso corrente. Brasília, 1984.

PALMER, J. P.; WALTER, R. M.; ENSINCK, J. W. Arginine-stimulated acute phase of insulin and glucagons secretion. In normal man. *Diabetes*, v. 24, p. 735-740, 1975.

PARSONS, A. A.; STRIJBOS, P. J. L. M. The neuronal versus vascular hypothesis of migraine and cortical spreading depression. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 3, p. 1-5, 2003.

PECK, M. D.; BABCOCK, G. F.; ALEXANDER, J. W.; BILLIAR, T.; OCHOA, J. High doses of dietary arginine during repletion impair weight gain and increase infectious mortality in protein-malnourished mice. *British Journal of Nutrition*, v. 74, p. 787-795, 1995.

PEELING, A. N.; SMART, J. L. Successful prediction of immediate the brain growth spurt on capillarity and synapse-to-neuron ratio of cerebral cortex in rats. *Metabolic Brain Disease*, v. 9, n. 1, p. 81-95, 1994.

PICANÇO-DINIZ, C.W.; ARAÚJO, M. S.; BORBA, J. M. C.; GUEDES, R. C. A. NADPH-diaforase containing neurons and biocytin-labelled axon terminal in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutritional Neuroscience*, v. 01, p. 35-48, 1998.

PRASAD, C. Food, mood and health: a neurobiologic Outlook. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 1517-1527, 1998.

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

PRICKAERTS, J.; DE VENTE, J.; ITTERSUM, M. M.; STEINBUSCH, H. W. M. Behavioural, neurochemical and neuroanatomical effects of chronic postnatal N-nitro-L-arginine methyl ester treatment in neonatal and adult rats. *Neuroscience*, v. 87, n. 1, p. 181-195, 1998.

RACOTTA, R.; SOTO-MORA, L. M.; PIÑON-LOPEZ, M. J.; QUEVEDO, L. Effect of intraperitoneal nitroprusside and adrenergic agonists on food and water intake. *Physiology & Behavior*, v. 63, p. 455-461, 1998.

READ, S. J.; PARSONS, A. A. Nitric oxide does not mediate cerebral blood flow changes during cortical spreading depression in the anaesthetised rat. *Neuroscience Letters*, v. 250, n. 2, p. 115-118, 1998.

READ, S. J.; SMITH, M. I.; HUNTER, A. J.; PARSONS, A. A. The dynamics of nitric oxide release measured directly and in real time following repeated waves of cortical spreading depression in the anaesthetised cat. *Neuroscience Letters*, v. 232, p. 127-130, 1997.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal Nutrition*, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RESNICK, O.; MILLER, M.; FORBES, W.; HALL, R.; KEMPER, T.; BRONZINO, J.; MORGANE, J. Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neuroscience & Biobehavioral*, v. 3, p. 233-246, 1979.

RIOBÓ, N. A.; MELANI, M.; SANJUÁNI, N.; FISZMAN, M. L.; GRAVIELLE, M. C.; CARRERAS, M. C.; CADENAS, E.; PODEROSO, J. J. The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase in rat brain development. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 45, p. 42447-42455, 2002.

ROBBINS, R. A.; GRISHAM, M. B. Nitric Oxide. *Int J Biochem. Cell Biol.*, v. 29, p. 857-860, 1997.

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

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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, p. 663-669, 1997.

RODRIGO, J.; ALONSO, D.; FERNÁNDEZ, A. P.; SERRANO, J.; LÓPEZ, J. C.; ENCINAS, J. M.; VIZARRA, P. F.; CASTRO, S.; PEINADO, M. A.; PEDROSA, J. A.; RICHARD, A.; MURILLO, M.; SANTACANA, M.; BENTURA, M. L.

UTTENTHAL, R. L.O. Nitric oxide: synthesis, neuroprotection and neurotoxicity. *An Sist Sanit Navar*, v. 23, n. 2, p. 195-235, 2000.

SANTOS, A. A. Nutrição, sistema serotoninérgico e funções neurais: efeito do citalopram sobre a depressão alastrante cortical em ratos. Recife: Dissertação (Mestrado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 101 p., 2001.

SANTOS, R. S. *Nutrição, Hipertireoidismo precoce e desenvolvimento cerebral: estado em ratos recém-desmamados*. Recife, 2000. 62 p. Tese (Mestrado em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 2000.

SANTOS-MONTEIRO, J. Nutrição, privação sensorial e plasticidade cerebral. Recife: Tese (Doutorado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 83 p., 2002.

SANTOS-MONTEIRO, J.; TEODÓSIO, N. R.; GUEDES, R. C. A. Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats. *Nutritional Neuroscience*, v. 3, p. 29-40, 2000.

SHANKAR, R.; ZHU, J.; LADD, B.; HENRY, D.; SHEN, H.; BARON, A. D. Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. *Journal Clinical Investigation*, v.102, n.7, p. 1403-1412, 1998.

SHIMIZU, K.; MILLER, A. W.; ERDÖS, B.; BARI, F.; BUSIJA, D. W. Role of endothelium in hyperemia during cortical spreading depression (CSD) in the rat. *Brain Research*, v. 928, p. 40-49, 2002.

SMART, J. L.; DOBBING, J.; ADLARD, B. P. F.; LINCH, A.; SANDE, J. Vulnerability of developing brain: relative effects of growth restriction during the fetal and suckling periods on behavior and brain composition in adult rats. *Journal Nutrition*, v. 103, p. 1327-1338, 1973.

SMART, T. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. VII. Relative effects of fetal and early postnatal undetal and early postnatal undernutrition on reflex on ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Research*, v. 33, p. 303-314, 1971.

SQUADRITO, F.; CALAPAI, G.; ATAVILLA, D.; CUCINITTA, D.; ZINGARELLI, B.; CAMPO, G. M.; ARCORACI, V.; SAUTEBIN, L.; MAZZAGLIA, G.; CAPUTI, A. P. Food deprivation increases brain nitric oxide synthase and depress brain serotonin levels in rats. *Neuropharmacology*, v. 33, n. 1, p. 83-86, 1994.

SQUADRITO, F.; CALAPAI, G.; CUCINOTTA, D.; ATAVILLA, D.; ZINGARELLI, B.; IOCULANO, M.; URNA, G.; SARDELLA, A.; CAMPO, G. M.; CAPUTI, A. P. Anoretic activity of N^G-nitro-L-arginine, an inhibitor of brain nitric oxide synthase, in obese Zucker rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 230, p. 125-128, 1993.

STRIJBOS, P. J. L. M. Nitric oxide in cerebral ischemic neurodegeneration and excitotoxicity. *Critical Reviews in Neurobiology*, v. 12, n. 3, p. 223-243, 1998.

TONKISS, J.; COHEN, C. A.; SPARBER, S. B. Different methods for producing neonatal undernutrition in rats cause different brain changes in the face of equivalent somatic growth parameters. *Developmental Neuroscience*, v. 10, n. 3, p. 141-151, 1988.

ULMER, H. J.; DE LIMA, V. M.; HANKE, W. Effects of nitric oxide on the retinal spreading depression. *Brain Research*, v. 691, p. 239-42, 1995.

VISEK, W. J. arginina and disease states. *Journal of Nutrition*, v. 115, p. 532-541, 1985.

WAHL, M.; SCHILLING, L.; PARSONS, A. A.; KAUMANN, A. Involvement of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and nitric oxide (NO) in the pial artery dilatation elicited by cortical spreading depression. *Brain Research*, v. 637, p. 204-210, 1994.

WAITZBERG, D. L.; LOGULLO, P. Proteínas. In: WAITZBERG, D. L. *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica*. v. 1, 3 ed. Atheneu: São Paulo, 2000. p. 35-50.

WANG, M.; OBRONOVITCH, T. P.; URENJAK, J. Effects of the nitric oxide donor DEA/NO on cortical spreading depression. *Neuropharmacology*, v. 44, p. 949-957, 2003.

WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *Journal Nutrition*, v. 128, p. 1249-1252, 1998.

XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R. C. A. Differential affect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 24, p. 1277-1281, 1991.

YOSHIMATSU, H.; CHIBA, S.; TAJIMA, D.; AKEHI, Y.; SAKATA, T. Histidine suppresses food intake through its conversion into neuronal histamine. *Experimental Biology and Medicine*, v. 227, n. 1, p. 63-68, 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 109/2002

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE

Ao Prof. Rubem Carلو de Araújo Guedes

Departamento de Nutrição da UFPE

Prezado Professor,

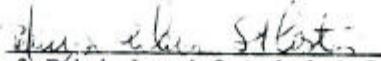
Após o recebimento de seu projeto de pesquisa intitulado **“Administração exógena de L-arginina em ratos lactentes e Depressão alastrante cortical”**, os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) analisaram os aspectos relativos aos protocolos experimentais adotados.

Concluímos 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. Belmira Lara da S. Andrade da Costa

Coordenadora da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE

ANEXO 2

A composição básica da dieta “Labina[®]”, de acordo com a Agribands Purina do Brasil é à base de milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, sal, e pré-mix.

Enriquecimento de micronutrientes por Kg de Produto:

Vitamina A	20000 UI
Vitamina D3	6000
Vitamina E	30 UI
Vitamina K	6 mg
Vitamina B12	10 mcg
Vitamina B2	28 mg
Pantotenato de Cálcio	24 mg
Niacina	95 mg
Tiamina	4 mg
Colina	2000 mg
Piridoxina	6 mg
Biotina	0,1 mg
Ácido Fólico	0,5 mg
Manganês	50 mg
Iodo	2 mg
Ferro	65 mg
Zinco	35 mg
Cobre	26 mg
Antioxidante	100 mg

Níveis de Garantia:

Umidade (máx.)	13,0%
Proteína (mín.)	23,0%
Extrato Etéreo (mín.)	2,5%
Matéria fibrosa (máx.)	9,0%
Matéria mineral (máx.)	8,0%
Cálcio (Ca) (máx.)	1,8%
Fósforo (P)	0,8%

FONTE: Labina[®] (Agribands Purina do Brasil)

ANEXO 3

Centro de Química de Proteínas

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Aminograma de Ração para Roedores (LABINA)

Procedência: LAFINNT – Deptº de Nutrição – UFPE

AMINOÁCIDO	Amostra A	Amostra A	Amostra B #	Amostra B #	MÉDIA
	# 1	# 2	1	2	
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	

Valores expressos em g/Kg da amostra.

