

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:

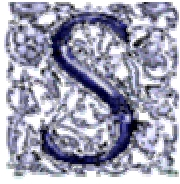
Ana Paula Rocha de Melo

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 mestrandia **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 tranquilo 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 Alastrante.....	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	Varição 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.