

VANESSA FERNANDES DA SILVA ALMEIDA COIMBRA

**Efeito da suplementação neonatal de L-arginina sobre os parâmetros ponderais e
histomorfométricos do rim de ratos jovens e adultos**

Recife

2014

VANESSA FERNANDES DA SILVA ALMEIDA COIMBRA

**Efeito da suplementação neonatal de L-arginina sobre os parâmetros ponderais e
histomorfométricos do rim de ratos jovens e adultos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Professora Dr^a Manuela Figueiroa Lyra de Freitas
Co-Orientador: Professor Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Recife

2014



**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA**

AUTORA: VANESSA FERNANDES DA SILVA ALMEIDA COIMBRA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

**NOME DA DISSERTAÇÃO: "EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO NEONATAL DE L-
ARGININA SOBRE OS PARÂMETROS PONDERAIS E HISTOMORFOMÉTRICOS
DO RIM DE RATOS JOVENS E ADULTOS".**

ORIENTADORA: PROF^a DR^a MANUELA FIGUEIROA LYRA DE FREITAS

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. NICODEMOS TELES PONTES FILHO

DATA DA DEFESA: 12 DE SETEMBRO DE 2014

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior

Prof^a Dr^a Sandra Lopes de Souza

Prof. Dr. Nicodemus Teles Pontes Filho

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof^a Catarina de Oliveira Neves

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Prof. Mário Ribeiro de Melo Júnior

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA**

Prof^a Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

CORPO DOCENTE

Prof^a Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Prof. Jacinto da Costa Silva Neto

Prof^a Liriane Baratella Evêncio

Prof. Lucas André Cavalcante Brandão

Prof^a Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Prof^a Maria Bernadete Sousa Maia

Prof. Mario Ribeiro de Melo Júnior

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Prof^a Paloma Lys de Medeiros

Prof^a Rejane Pereira Neves

Prof. Roberto José Vieira de Mello

Prof^a Wylla Tatiana Ferreira-e-Silva

RECIFE

2014

Dedico este trabalho aos meus pais, Sandra e Rogério, por todo ensinamento, amor e dedicação,

À Andressa e Larissa, minhas irmãs e melhores amigas,

Ao meu esposo, Tiago, companheiro que muito me apoia e incentiva com amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso Criador, que ilumina minha mente, me fortalece e capacita em tudo. Sou grata pela alegria que me proporciona na conclusão dessa etapa.

À Professora Manuela Figueiroa, pela orientação, tempo e dedicação disponibilizados. Pela confiança e oportunidade de trabalho, e também pelo incentivo. Obrigada pela palavra encorajadora para seguir em frente e amizade demonstrada.

Ao Professor Nicodemos Teles e Professor Mário Ribeiro, pelos conhecimentos transmitidos e tempo disponibilizado, que foi muito importante para conclusão deste trabalho.

À Professora Sandra Lopes, sempre muito gentil e prestativa, pela contribuição em outra oportunidade nesse mesmo período de mestrado.

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia, pela oportunidade de participar deste programa e pela qualidade de ensino oferecida e com coordenadores e funcionários sempre muito prestativos e atenciosos.

Aos colegas de turma, por caminharmos juntos durante o curso em boa convivência e amizade.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial, e seus níveis plasmáticos são mantidos através da dieta e degradação de proteínas e envolve várias vias metabólicas. A L-arginina medeia relevantes funções renais, participa na manutenção da taxa de filtração glomerular, do tônus vascular regional e do fluxo sanguíneo renal, e no controle da hemodinâmica glomerular, por meio da retroalimentação túbulo-glomerular e liberação de renina. A administração de L-arginina pode ter efeitos diversos, com reversão de alterações renais demonstradas através de análises morfométricas ou da função renal. Assim, não se sabe o efeito desta suplementação em período neonatal e suas repercussões nas fases posteriores da vida. O presente estudo objetivou investigar os efeitos da suplementação com L-arginina no período pós-natal precoce sobre o peso renal absoluto e relativo e parâmetros morfométricos em rins de ratos jovens e adultos. Utilizou-se 16 ratos machos que receberam por gavagem L-arginina (300mg/Kg/dia) ou água do 7^o-35^o dias pós-natal. Quatro grupos experimentais foram formados de acordo com a administração de L-arginina ou água e a idade do animal 35-45 dias (jovem), 90-120 dias (adulto). Após o sacrifício, os rins direitos foram pesados, fragmentados e mantidos em formalina 10% tamponada por 48 horas, foram desidratados e diafanizados e emblocados em parafina, cortados com 4µm de espessura e corados em hematoxilina-eosina. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por câmera acoplada ao microscópio óptico e depois analisadas pelo software Image J. Como resultados, constatou-se que a suplementação precoce com L-arginina não interferiu no número de glomérulos, peso renal absoluto e relativo. Nos ratos adultos, a suplementação promoveu aumento da área média do glomérulo, da área média da cápsula de Bowman e da área média do espaço urinário ($p<0,05$). No grupo jovem, a suplementação levou ao aumento da área média da cápsula de Bowman e da área média do espaço urinário ($p<0,001$). Pode-se inferir que os efeitos da suplementação precoce com L-arginina em algumas estruturas renais perduram até a vida adulta.

Palavras-chave: Nutrição. Arginina. Rim. Peso-Idade. Glomérulos Renais.

ABSTRACT

L-Arginine is a semi-essential amino acid, and its plasma levels are maintained through diet and protein degradation and involves several metabolic pathways. The L-arginine mediates relevant kidney function, participates in the maintenance of glomerular filtration rate, regional and renal blood flow vascular tone, and control of glomerular hemodynamics, by tubuloglomerular feedback and renin release. L-arginine administration may have different effects, with reversal of renal impairment demonstrated by morphometric analysis or renal function. So, do not know the effect of supplementation on neonatal period and its impact on later life. This study aimed to investigate the effects of supplementation with L-arginine in the early postnatal period on the absolute and relative kidney weight and morphometric parameters in kidneys of young and adult rats. We used 16 rats receiving L-arginine by gavage (300 mg / kg / day) or water postnatal days 70-350. Four experimental groups were formed according to the administration of L-arginine and water and the animal's age 35-45 days (Young), 90-120 days (adult). After sacrifice, the right kidneys were weighed, fragmented and kept in 10% buffered formalin for 48 hours, and diaphanized were dehydrated and embedded in paraffin, cut with 4µm thick and stained with hematoxylin-eosin. Images of sections were captured by optical microscope coupled to the camera and then analyzed by the software Image J. As a result, it was found that early supplementation with L-arginine did not affect the number of glomeruli, absolute and relative kidney weight. In adult rats, the supplementation increased the average size of the glomerulus, the average area of Bowman's capsule and the middle area of the urinary space ($p < 0.05$). In the young group, supplementation led to higher average area of Bowman's capsule and the average area of space urine ($p < 0.001$). Can be inferred that the effects of early supplementation persist into adulthood.

Keywords: Nutrition. Arginine. Kidney. Weight by Age. Kidney Glomerulus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Lista de figuras da revisão

Figura 1- Visão geral do metabolismo da L-arginina.....	18
---	----

LISTA DE TABELAS

Lista de tabelas do artigo original

Tabela 1 – Efeito da suplementação de L-arginina no peso absoluto e relativo do rim direito de ratos jovens e adultos e no número de glomérulos renais.....	30
Tabela 2 – Comparação do Peso absoluto e relativo do rim direito e número de glomérulos renais entre idades experimentais (jovens e adultos) de ratos do grupo controle e suplementados com L-arginina.....	31
Tabela 3 – Efeito da suplementação precoce com L-arginina em ratos jovens e adultos sobre parâmetros histomorfométricos do glomérulo renal.....	32
Tabela 4 – Parâmetros histomorfométricos de glomérulos renais de ratos com e sem suplementação precoce de L-arginina, testando-se a hipótese de mudança destes parâmetros em animais jovens e adultos.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGAT – Arginino-Glicina-Amidinotransferase

ASL – Arginino-Succinato Liase

ASS – Arginino-Succinato Sintetase

NO – Nitric Oxide

NOS – Nitric Oxide Sintase

eNOS – endotelial Nitric Oxide Sintase

nNOS – neuronal Nitric Oxide Sintase

iNOS – induced Nitric Oxide Sintase

DP – Desvio Padrão

SUMÁRIO

	Pág.
1 APRESENTAÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Os rins.....	16
2.2 L-arginina e suas vias metabólicas.....	17
2.3 Os rins e a L-arginina.....	19
3 MÉTODO.....	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Suplementação com L-arginina.....	22
3.3 Procedimento para retirada do rim e obtenção do peso absoluto e relativo...	23
3.4 Processamento do material biológico.....	23
3.5 Análise morfométrica.....	23
3.6 Análise estatística.....	24
3.7 Considerações Éticas.....	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Artigo original.....	25
5 CONCLUSÃO.....	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXOS.....	44
Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais da UFPE.....	44
Anexo B - Instruções aos autores da revista Journal of Molecular Histology.....	45

1 APRESENTAÇÃO

A nutrição desempenha um papel muito importante no desenvolvimento do organismo. Baseado em estudos epidemiológicos populacionais, David Barker (1996) elaborou a teoria da origem fetal das doenças do adulto, na qual a nutrição deficiente no período crítico de desenvolvimento — gestação e infância — originaria uma adaptação metabólica e/ou estrutural permanente que aumenta o risco de desenvolvimento de doença coronária e outras doenças associadas como a hipertensão arterial, a diabetes e o acidente vascular cerebral na vida adulta. Essa programação fetal está baseada no conceito de plasticidade fenotípica, que é a capacidade de um genótipo poder originar diferentes estados morfológicos ou fisiológicos em resposta a exposições diferentes durante o desenvolvimento (SECO et al., 2009).

O risco individual de doença é determinado pela interação de vários fatores, que incluem genes de susceptibilidade à doença, ambiente intra-uterino adverso, estilo de vida de risco no adulto (dieta, sedentarismo, tabaco, dentre outros) e envelhecimento (SECO et al., 2009). Em ratos, a desnutrição materna pode programar o número de néfrons causando, portanto, impacto sobre a pressão arterial nos ratos adultos favorecendo ao desenvolvimento de doenças renais (LANGLEY-EVANS et al., 1999).

São frequentes os estudos realizados pelos efeitos da suplementação alimentar precoce em animais submetidos à desnutrição intra-uterina ou portadores de outra condição patológica induzida experimentalmente, dentre eles, os tratamentos suplementares com aminoácidos como a L-arginina (ALVES et al., 2002, GIL et al., 2005, MAIA et al., 2006) e a L-citrulina (TAIN et al., 2010).

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial, uma vez que em adultos normais saudáveis a produção endógena ocorre em quantidades suficientes. Este aminoácido participa de diversas rotas metabólicas, participando da síntese de proteínas, creatina, uréia, poliaminas, agmatina, prolina e é a principal fonte de óxido nítrico (NO) através da via óxido nítrico sintase (NOS) (MORRIS, 2007).

A administração suplementar de L-arginina em períodos precoces do desenvolvimento demonstrou promover alterações morfofisiológicas tais como: maior arborização dendrítica em neurônios do córtex visual de ratos saudáveis (MAIA et al., 2006), assim como prevenir a hipertrofia glomerular em prole de ratas diabéticas (CANAVALL et al., 2007). Apesar dos

benefícios supracitados, em outros estudos, a suplementação de L-arginina provocou alterações como o aumento da velocidade de propagação da depressão cortical alastrante em ratos (FRAZÃO et al., 2008; MAIA et al., 2009; MONTEIRO, 2011).

Há uma escassa literatura sobre os efeitos da suplementação alimentar com L-arginina no tecido renal durante a vida extra-uterina de ratos saudáveis. Alguns estudos relatam que a L-arginina mostrou-se capaz de reverter danos causados pela diabetes mellitus e desnutrição sobre o rim. Portanto, torna-se importante uma análise morfométrica dos rins de organismos normonutridos submetidos à suplementação extra-uterina de L-arginina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A nutrição perinatal exerce influência sobre o desenvolvimento e homeostase orgânica (LANGLEY-EVANS, 1999). Alterações nutricionais durante o período de desenvolvimento podem interferir no desenvolvimento renal (GIL, 2005). Vários estudos têm sido relatados utilizando suplementação de aminoácidos como a L-arginina e avaliando seu efeito sobre diversos órgãos, de modo especial, sobre os rins (ALAM, 2013). A seguir destacaremos os rins, a L-arginina e como a L-arginina pode interferir no desenvolvimento renal.

2.1 Os rins

O rim é um órgão par, encapsulado, localizados na região retroperitoneal. O lado medial de cada rim contém uma região denominada hilo, por onde passam a artéria e a veia renal, vasos linfáticos, nervos e o ureter, que leva a urina do rim à bexiga (GUYTON et al., 2006).

A unidade funcional do rim é o néfron: uma estrutura composta pelo glomérulo (sítio da filtração glomerular) e túbulos que reabsorvem e excretam solutos, conectando-se aos ductos coletores do sistema (MURAWSKI et al., 2010). Há uma grande oscilação no número total de néfrons nos rins humanos, tendo sido observado por meio de necrópsias, variações de 300 mil a 2 milhões de unidades por rim (INGELFINGER et al., 2003).

O glomérulo representa uma unidade de filtração altamente estruturada, composto de células endoteliais glomerulares, células mesangiais, podócitos e células epiteliais parietais (SCHELL et al., 2014). As células mesangiais são mononucleares em forma irregular, aspecto estrelado e ocupam a região central dos lóbulos glomerulares onde encontram-se embebidas em uma matriz mesenquimal, chamada de matriz mesangial. As células mesangiais exercem função de contração/relaxamento, controle do fluxo sanguíneo, suporte estrutural ao glomérulo, síntese de prostaglandinas e fagocitose. Estima-se que em ratos Wistar essas células representem um terço das células glomerulares, entre 600 a 750 células. As células endoteliais representam mais de 50% do total das células glomerulares (PINTO, 1998).

A nefrogênese em mamíferos compreende o desenvolvimento de três estágios de órgãos excretores, o pronefro, o mesonefro (órgãos transitórios) e o metanefro (este se desenvolve subsequentemente em rins permanentes) (MOORE et al., 2008). O desenvolvimento metanéfrico começa na quarta ou quinta semana em humanos, e, em camundongos, próximo ao décimo primeiro dia de gestação. Em humanos, a nefrogênese está

completa na trigésima sexta semana gestacional; em ratos entretanto a nefrogênese continua até 10 a 12 dias após o nascimento (MESQUITA et al., 2010).

A homeostase orgânica está na dependência direta do funcionamento dos rins que excretam produtos tóxicos do metabolismo, regulam precisamente as concentrações corpóreas de água e sal, mantém o balanço ácido apropriado do plasma e age como órgão endócrino secretando hormônios como a eritropoetina, renina e prostaglandinas (ALPERS et al., 2004).

2.2 L-arginina e suas vias metabólicas

A arginina é um aminoácido básico, estável em soluções aquosas e à esterilização (WU et al., 2000; ZALOGA et al., 2004). Possui quatro átomos de nitrogênio por molécula, e devido a essa característica estrutural é o principal carreador de nitrogênio em humanos e animais, apresentando importante função na síntese protéica e no metabolismo intermediário de nitrogênio pela participação no ciclo da uréia (WILMORE et al., 2004). É precursora da síntese de moléculas com grande importância biológica como ornitina, poliaminas, óxido nítrico, creatina, agmatina, glutamina e prolina, dentre outros (WILMORE et al., 2004; CHIARLA et al., 2005).

Tradicionalmente é considerada não essencial para adultos devido à capacidade do organismo de sintetizá-la (HARDY et al., 2006). No entanto, no início da vida, bem como em certas condições clínicas, como trauma e sepse principalmente, ocorre aumento na sua utilização, o qual excede a capacidade de produção corporal. Dessa forma, a denominação mais adequada é aminoácido condicionalmente essencial (SUCHNER et al., 2002; PAN et al., 2004).

Os níveis plasmáticos de L-arginina são mantidos a partir de fontes: exógena (dieta) e endógena (degradação proteica corporal e síntese endógena pela citrulina). A síntese endógena de arginina varia de acordo com a espécie, estado nutricional e estágio de desenvolvimento. A arginina está presente em alimentos como: carnes, leite, ovos, queijos, alho, ervilhas e grãos. A ingestão normal de arginina em uma dieta ocidental é de 5 a 7 gramas por dia e a produção endógena é de, em média, 15 a 20 gramas por dia (WU et al., 2000; MORRIS, 2004).

A absorção da arginina ocorre no jejuno e íleo a partir de componentes saturáveis e não saturáveis. No cólon, a absorção é reduzida (SYNOBER et al., 1995). A arginina é precursora da creatina, um importante substrato do metabolismo energético. A ingestão

dietética de arginina é de aproximadamente 5g/dia em adultos. Destes, em média 2,3g são utilizados para síntese de creatina (ARGAMAN et al., 2003).

A bioquímica da arginina é complexa e envolve diversas vias metabólicas e sistemas orgânicos. A L-arginina é continuamente sintetizada no fígado a partir do ciclo da uréia, porém não há síntese do aminoácido por esse órgão devido à alta atividade da enzima arginase, que resulta em rápida hidrólise da arginina (BROSNAN, 2004; BAYLIS, 2006).

Diariamente, o rim produz dois gramas de L-arginina, por ação da succinato-arginino sintetase (ASS), verificando-se também a produção de dois gramas de creatina a partir da L-arginina, pela via arginino-glicina-amidinotransferase (AGAT) e a reabsorção de cerca de três gramas de L-arginina nos túbulos contorcidos proximais (BROSNAN, 2004).

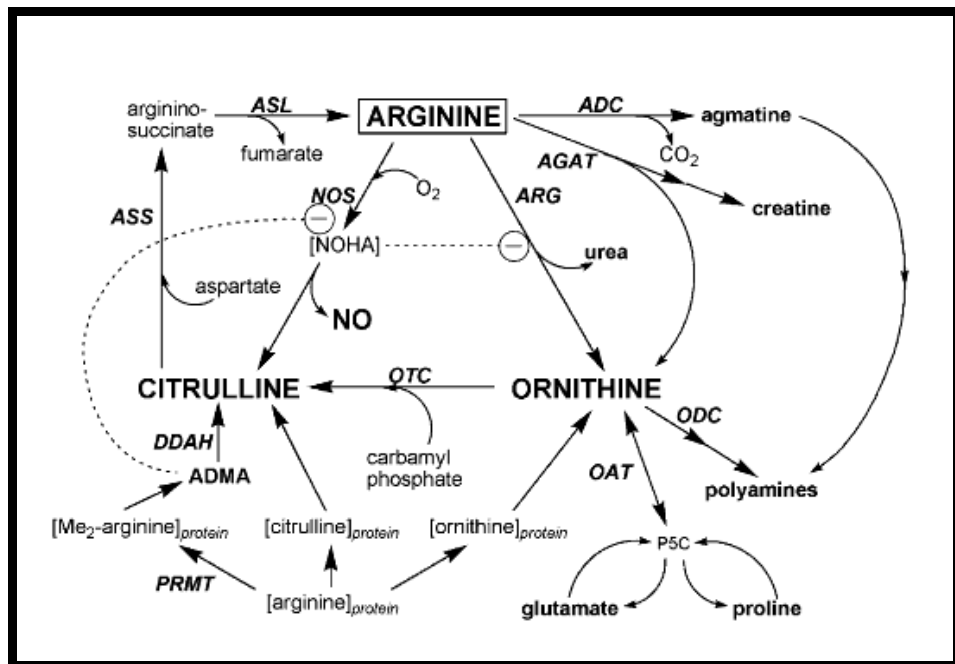


Figura 1. Visão geral do metabolismo da L-arginina. (MORRIS, 2007)

A degradação de proteínas corporais e dietéticas gera arginina, que pode ser diretamente utilizada no ciclo da uréia no tecido hepático, ou transformada no epitélio intestinal em ornitina que, juntamente com a glutamina secretada como glutamato, será convertida em citrulina e esta em arginina no ciclo renal (FILHO, 2000; ZILBERTEIN, 2000).

Embora a síntese de L-arginina a partir de citrulina, pode ocorrer em muitos tipos de células, uma grande parte da síntese endógena concentra-se no córtex renal e no fígado

(BROSAN, 2006) e de uma colaboração entre as células epiteliais do intestino delgado e células do túbulo proximal do rim (o "eixo intestinal-renal" da síntese de arginina) (MORRIS, 2007).

A citrulina produzida no intestino a partir de aminoácidos dietéticos (prolina, glutamina, glutamato) e glutamina circulante, é absorvida e transportada para os rins. Nos túbulos proximais renais, a citrulina é convertida em arginina pela ASS e argininosuccinato liase (ASL). Esse órgão é o principal responsável pela manutenção dos níveis plasmáticos de arginina. Outras células que expressam a ASS e ASL também podem converter citrulina em arginina. Desta forma, em última análise, a síntese de arginina é dependente do metabolismo intestinal, uma vez que os enterócitos sintetizam citrulina do L-glutamato, L-glutamina e L-prolina (TAPIERO et al., 2002; EVANZ et al., 2004).

A arginina também é substrato na síntese proteica, podendo ser convertida em prolina, que gera colágeno e, por isso, possui importante função na cicatrização, além de glutamato e glutamina, aminoácidos comuns na maioria das proteínas, com papel na manutenção da integridade intestinal (CINTRA et al., 2008).

Existem duas vias de degradação direta da arginina. A primeira é mediada pela arginase, liberando ornitina e uréia, enquanto a outra é catalisada pela NOS e tem como produto o NO (BROSAN et al., 2004). A reação catalisada pela enzima arginase é responsável pela formação de uréia, ornitina, prolina, poliaminas, glutamato e glutamina. Existem duas isoformas distintas da arginase (tipo 1 e 2). A arginase do tipo 1 parece ser a maior responsável pela síntese de poliaminas, enquanto a arginase do tipo 2 direciona a L-arginina para a síntese de ornitina e prolina. A prolina é convertida a hidroxiprolina e, então, a colágeno, um substrato necessário à cicatrização (STECHMILLER et al., 2004).

Quando metabolizada à citrulina, a arginina promove a formação de compostos nitrogenados como: NO, nitritos e nitratos. Grande parte da importância da L-arginina está atribuída à sua função precursora à síntese de NO, uma vez que esta se constitui no único substrato para síntese de NO e para todas as isoformas NOS eucarióticas (POPOVIC et al., 2007).

2.3 Os rins e a L-arginina

Os rins são órgãos particularmente susceptíveis aos desbalanços nutricionais durante a vida perinatal (LUCAS et al., 1997; PAIXÃO et al., 2001; SILVA et al., 2009), por isso é um

órgão de excelência para desenvolvimento de estudos experimentais que tenham o intuito de abordar a programação fetal.

A L-arginina é a principal fonte para a geração do NO, o qual medeia relevantes funções no nível renal, quer seja pela participação na manutenção da taxa de filtração glomerular, do tônus vascular regional e do fluxo sanguíneo renal (via sintase do óxido nítrico endotelial - eNOS); quer seja pela colaboração do controle da hemodinâmica glomerular, por meio da retroalimentação túbulo-glomerular e liberação de renina - mediado pela síntese do óxido nítrico neuronal -nNOS (CHERLA & JAIMES, 2004).

Foi evidenciado que a exposição fetal à dieta hipoprotéica causou um efeito deletério sobre a nefrogênese, reduzindo o número final de néfrons formados, promovendo o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica ao longo da vida da prole estudada (LANGLEY-EVANS et al., 1999). Por outro lado, a suplementação alimentar com L-arginina pós-desmame mostrou-se capaz de minimizar a hipertensão arterial sistêmica, a proteinúria e a hipertrofia glomerular, resultante do hiperfluxo sobre o menor número de néfrons formados em prole de ratas desnutridas (GIL et al., 2005). Além disso, a suplementação alimentar com L-arginina no pós-desmame, a partir de 28 dias de vida extra-uterina, reverteu a hipertrofia glomerular em prole de ratas diabéticas (CANAVALL et al., 2007).

Um estudo evidenciou que a suplementação com L-arginina em ratos submetidos à desnutrição intra-uterina levou à diminuição dos níveis pressóricos, diminuição da proteinúria e aumento da taxa de filtração glomerular (ALVES et al., 2002). Outro estudo também indica um efeito que a suplementação oral com L-arginina em ratos atenuou ou normalizou mudanças no coração, fígado e pâncreas pela redução da inflamação e do estresse oxidativo associados com ingestão aumentada de carboidratos e gorduras. Esses efeitos ocorrem porque a L-arginina é precursora do NO, que é responsável pela manutenção do tônus vascular e função plaquetária, regulação da pressão sanguínea e regulação do metabolismo de glicose e ácidos graxos (ALAM et al., 2013).

O uso terapêutico de suplementos desse aminoácido tem sido proposto para situações estabelecidas de doença renal crônica, uma vez que a produção renal do mesmo encontra-se em progressivo declínio nesses casos, levando à redução dos níveis de NO circulante com consequente repercussão cardiovascular e exacerbação do dano renal (BAYLES et al., 2006). Um estudo recente realizado em pacientes idosos, que investigou o efeito da ingestão de

proteínas sobre a função renal, demonstrou que a alta ingestão protéica não teve um maior efeito no declínio da função renal entre homens e mulheres idosos (BEASLEY et al., 2014).

Como evidenciado a partir dos estudos relatados acima, a administração de L-arginina pode ter efeitos diversos, com reversão de alterações renais demonstradas através de análises morfométricas ou da função renal. Assim, não se sabe o efeito desta suplementação em período neonatal e suas repercussões nas fases posteriores da vida. Desta forma, objetivou-se com esse estudo analisar o efeito da suplementação com L-Arginina, durante o período neonatal, sobre o peso renal e parâmetros morfométricos em rins de ratos jovens e adultos, verificando se tais efeitos perduram até a vida adulta.

3 MÉTODOS

São descritos a seguir os materiais e métodos utilizados para a realização dessa pesquisa.

3.1 Animais

Foram utilizados 16 ratos machos albinos, da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Esses animais foram mantidos sob condições padrão do biotério, em salas à temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, submetidos a um ciclo artificial claro-escuro de 12/12h (o escuro iniciando-se às 19h), com livre acesso à água e comida (dieta comercial Labina-Evialis do Brasil Nutrição Animal LTDA).

Para as determinações experimentais, os ratos machos foram distribuídos aleatoriamente, 24h após o parto (primeiro dia de vida, considerando-se o dia de nascimento como dia zero), em ninhadas de seis filhotes por mãe. Em seguida, os filhotes foram separados de acordo com a administração de L-arginina e a idade, animais jovens (35-45 dias) e adultos (90-120 dias), formando-se os quatro grupos experimentais: Controle Jovem, composto de quatro animais machos que receberam água por gavagem desde o 7º até 35º dia e foram sacrificados entre o 35º e o 45º dia; Controle Adulto, composto por quatro animais machos adultos que receberam água por gavagem desde o 7º até 35º dia e foram sacrificados entre o 90º e o 120º dia; Suplementado Jovem, composto de quatro animais machos que receberam suplementação com L-Arginina desde o 7º até 35º e foram sacrificados entre o 35º e o 45º dia; Suplementado Adulto, composto por quatro animais machos adultos que receberam L-arginina por gavagem desde o 7º até 35º dia e foram sacrificados entre o 90º e o 120º dia.

3.2 Suplementação com L-arginina

Os animais suplementados com L-arginina receberam dose de 300mg/kg/dia (Grupos: Suplementado Jovem e Suplementado Adulto) e os animais controle receberam o volume equivalente do veículo, água destilada (Grupos: Controle Jovem e Controle Adulto).

Foi administrada diariamente arginina ou água por gavagem, com o objetivo de que tal suplementação se desse da maneira mais próxima à ingestão fisiológica, do 7º ao 35º dia de vida sempre no horário das 6 às 8h, segundo metodologia descrita por Monteiro et al., 2011,

nas seguintes concentrações: 10mg/ml na primeira e segunda semana de tratamento; 20mg/ml, na terceira semana e 30mg/ml na quarta semana.

3.3 Procedimento para retirada do rim e obtenção do peso absoluto e relativo

Antes do sacrifício os animais foram pesados em balança (sensibilidade de até 0,1g) de acordo com a idade dos grupos experimentais. Cada animal foi submetido a uma anestesia contendo mistura de uretana 10% + cloralose 0,4%, à dose de 1000mg/kg de uretana + 40mg/kg de cloralose, pela via intraperitoneal. Em seguida, foi retirado o rim direito que também foi pesado para obtenção do peso absoluto e relativo e em seguida foram colocados em solução de formol a 10% tamponado. Para o cálculo do peso relativo, foi realizada a divisão do peso absoluto do órgão com o peso corporal do animal no dia do sacrifício.

3.4 Processamento do material biológico

Posteriormente, o rim direito foi seccionado em duas partes, em corte coronal, dividindo-se o hilo ao meio utilizando-se navalha descartável. Os fragmentos foram mantidos em formalina 10% tamponada por um período de ± 48 h. Em seguida foram desidratados, diafanizados e parafinizados.

Para a execução da pesquisa proposta, secções renais foram obtidas com 4 μ m de espessura através do micrótomo (Leica). De cada rim foram feitas preparações histológicas coradas em hematoxilina-eosina. Todos os cortes foram montados em lâminas e lamínula utilizando-se Entellan (Merck).

3.5 Análise morfométrica

Imagens dos cortes histológicos dos rins foram visualizadas em microscópio óptico (MOTIC BA 200) utilizando-se objetivas de acordo com a finalidade a ser estudada, capturadas e digitalizadas através de uma câmera digital (MOTICAM 1000 1.3 M Pixel USB 2.0) acoplada a um microcomputador (Intel Dual Core 4GB 750GB). Para a contagem de glomérulos por campo, foi utilizada a objetiva com magnificação final de 100x e, para a análise de parâmetros morfométricos, foi utilizada a objetiva com magnificação final de 400x.

Com relação à contagem dos glomérulos, foram capturadas aleatoriamente 30 imagens representativas de um corte renal de cada animal dos diferentes grupos experimentais. A contagem dos glomérulos foi realizada manualmente pelo mesmo observador, sem

conhecimento dos grupos, registradas em planilhas do programa Excel, sendo retirada uma média aritmética por animal.

Para as análises dos seguintes parâmetros morfométricos: área do glomérulo e área da cápsula de Bowman, foram realizadas 20 imagens por corte renal de cada animal dos diferentes grupos experimentais, obtidas através de uma câmera acoplada ao microscópio. O programa utilizado foi o software de análise de imagens Image J. As áreas do glomérulo e da cápsula de Bowman foram obtidas através do contorno do glomérulo e a cápsula de Bowman à mão livre com ferramenta específica do Image J. Através da diferença da área da cápsula de Bowman e do glomérulo, obteve-se a área do espaço urinário. As imagens dos cortes histológicos foram processadas e armazenadas referindo sua magnificação final de aumento em escala de pixels proporcional às propriedades de cada campo histológico selecionado.

3.6 Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 13.0. Foi realizado o cálculo das médias e desvios-padrão das variáveis estudadas. Para a determinação da presença ou não de distribuição normal, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação das médias das variáveis entre dois grupos, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes. Os resultados foram apresentados sob a forma de tabelas. Em todos os casos, foi considerado como nível de significância para a rejeição da hipótese nula um valor de $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%.

3.7 Considerações Éticas

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), protocolo: 23076.005924/2008-80, e aprovado uma vez que segue as normas recomendadas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (anexo A).

4 RESULTADOS

Artigo original a ser submetido à revista Journal of Molecular Histology

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO NEONATAL DE L-ARGININA SOBRE OS PARÂMETROS PONDERAIS E HISTOMORFOMÉTRICOS NO RIM DE RATOS JOVENS E ADULTOS

Introdução

O glomérulo representa uma unidade de filtração altamente estruturada, composto de células endoteliais glomerulares, células mesangiais, podócitos e células epiteliais parietais (SCHELL et al., 2014). A nefrogênese em mamíferos compreende o desenvolvimento de três estágios de órgãos excretores, o pronefro, o mesonefro (órgãos transitórios) e o metanefro (este se desenvolve subsequentemente em rins permanentes) (MOORE et al., 2008). O desenvolvimento metanéfrico começa na quarta ou quinta semana em humanos, e, em camundongos, próximo ao décimo primeiro dia de gestação. Em humanos, a nefrogênese está completa na trigésima sexta semana gestacional; em ratos entretanto a nefrogênese continua até 10 a 12 dias após o nascimento (MESQUITA et al., 2010).

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial e precursora da síntese de moléculas como ornitina, poliaminas, óxido nítrico, creatina, agmatina, glutamina e prolina, dentre outros (ORTIZ et al., 2014; WILMORE et al., 2004; CHIARLA et al., 2005). Existem duas vias de degradação direta da arginina, a primeira é mediada pela arginase, liberando ornitina e uréia, enquanto a outra é catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS) e tem como produto o óxido nítrico (NO) (CYNOBER et al., 2005). A arginina está presente em alimentos como: carnes, leite, ovos, queijos, alho, ervilhas e grãos. A ingestão normal de arginina em uma dieta ocidental é de 5 a 7 gramas por dia e a produção endógena é de, em média, 15 a 20 gramas por dia (WU et al., 2000; MORRIS et al., 1998).

O rim possui papel importante no metabolismo da L-arginina, que é fonte principal de óxido nítrico através da via óxido nítrico sintase (NOS) onde podem ser detectadas três isoformas: neuronal NOS (nNOS), induzido NOS (iNOS) e endotelial NOS (eNOS) (ORTIZ et al., 2014; SCHNEIDER et al., 2003). O nNOS é expresso primeiramente na mácula densa e participa do controle da hemodinâmica glomerular. O iNOS é expresso no rim, em condições patológicas no mesângio glomerular. O eNOS é importante na manutenção da taxa de filtração glomerular, tônus vascular local e fluxo sanguíneo renal (CHERLA et al., 2004).

O NO medeia relevantes funções no nível renal, quer seja pela participação na manutenção da taxa de filtração glomerular, do tônus vascular regional e do fluxo sanguíneo renal (eNOS); quer seja pela colaboração do controle da hemodinâmica glomerular, por meio da retroalimentação túbulo-glomerular e liberação de renina - mediado pela síntese nNOS (CHERLA et al., 2004; JAIMEs et al., 2004).

Alterações nutricionais durante um período crítico de desenvolvimento renal, podem levar ao desenvolvimento de doenças na vida adulta. Existem evidências de que a suplementação de L-arginina tem efeito benéfico em doenças como hipertensão pulmonar, insuficiência cardíaca, disfunção endotelial e insuficiência renal aguda (SCHNEIDER et al., 2003). A administração de L-arginina tem sido capaz de reverter alterações observadas nos rins de animais que sofreram desnutrição durante o período perinatal (LUCAS et al., 1997; ALVES et al., 2002; GIL et al., 2005; BROWN et al., 2011).

A suplementação de L-arginina em períodos precoces do desenvolvimento demonstrou promover alterações morfofisiológicas, como a maior arborização dendrítica em neurônios do córtex visual de ratos (MAIA et al., 2006) e a prevenção da hipertrofia glomerular em prole de ratas diabéticas (CANAVALL et al., 2007). Apesar dos benefícios supracitados, em outros estudos, a suplementação de L-arginina provocou alterações como o aumento da velocidade de propagação da depressão cortical alastrante em ratos (FRAZÃO et al., 2008; MAIA et al., 2009; MONTEIRO et al., 2011).

O uso terapêutico de suplementos desse aminoácido tem sido proposto para situações estabelecidas de doença renal crônica, uma vez que a produção renal da mesma encontra-se em progressivo declínio nesses casos, levando à redução dos níveis de NO circulante com consequente repercussão cardiovascular e exacerbação do dano renal (BAYLES et al., 2006).

Os relatos da literatura sobre o efeito da suplementação precoce em animais que não sofreram desnutrição e as repercussões desta na idade adulta são escassos. Assim, o presente estudo objetivou analisar o efeito da suplementação de L-arginina durante o período precoce do desenvolvimento extra-uterino sobre o peso renal absoluto e relativo e parâmetros morfométricas em rins de ratos jovens e adultos, verificando se tais efeitos perduram até a vida adulta.

Material e Métodos

São descritos a seguir os materiais e métodos utilizados para a realização dessa pesquisa.

Animais

Foram utilizados 16 ratos machos albinos, da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Esses animais foram mantidos sob condições padrão do biotério, em salas à temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, submetidos a um ciclo artificial claro-escuro de 12/12h (o escuro iniciando-se às 19h), com livre acesso à água e comida (dieta comercial Labina-Evialis do Brasil Nutrição Animal LTDA).

Para as determinações experimentais, os ratos machos foram distribuídos aleatoriamente, 24h após o parto (primeiro dia de vida, considerando-se o dia de nascimento como dia zero), em ninhadas de seis filhotes por mãe. Os filhotes foram distribuídos em quatro grupos experimentais; de acordo com o procedimento de administração de L-arginina ou água destilada (Suplementado e Controle respectivamente) e a idade, sacrificados aos 35-45 dias e aos 90-120 dias (Jovens e Adultos respectivamente). Os animais suplementados com L-arginina receberam dose de 300mg/kg/dia (Grupos: Suplementado Jovem e Suplementado Adulto) e os animais controle receberam o volume equivalente do veículo, água destilada (Grupos: Controle Jovem e Controle Adulto).

Foi administrada diariamente arginina ou água destilada por gavagem, com o objetivo de que tal suplementação se desse da maneira mais próxima à ingestão fisiológica, do 7º ao 35º dia de vida sempre no horário das 6 às 8h, segundo metodologia descrita por MONTEIRO et al., 2011, nas seguintes concentrações: 10mg/ml na primeira e segunda semana de tratamento; 20mg/ml, na terceira semana e 30mg/ml na quarta semana.

Procedimento para retirada do rim e obtenção do peso absoluto e relativo

Antes do sacrifício os animais foram pesados em balança (sensibilidade de até 0,1g) de acordo com a idade dos grupos experimentais. Cada animal foi submetido a uma anestesia contendo mistura de uretana 10% + cloralose 0,4%, à dose de 1000mg/kg de uretana + 40mg/kg de cloralose, pela via intraperitoneal. Em seguida, foi retirado o rim direito que também foi pesado para obtenção do peso absoluto e relativo e em seguida foram colocados

em solução de formol a 10% tamponado. Para o cálculo do peso relativo, foi realizada a divisão do peso absoluto do órgão com o peso corporal do animal no dia do sacrifício.

Processamento do material biológico

Posteriormente, o rim direito foi seccionado em duas partes, em corte coronal, dividindo-se o hilo ao meio utilizando-se navalha descartável. Os fragmentos foram mantidos em formalina 10% tamponada por um período de ± 48 h. Em seguida foram fixados (desidratados, diafanizados e parafinizados) e emblocados.

Para a execução da pesquisa proposta, secções renais foram obtidas com aproximadamente 4 μ m de espessura através do micrótomo (Leica). De cada rim foram feitas preparações histológicas coradas em hematoxilina-eosina. Todos os cortes foram montados em lâminas e lamínula utilizando-se Entellan (Merck).

Análise morfométrica

Imagens dos cortes histológicos dos rins foram visualizadas em microscópio óptico (MOTIC BA 200) utilizando-se objetivas de acordo com a finalidade a ser estudada, capturadas e digitalizadas através de uma câmera digital (MOTICAM 1000 1.3 M Pixel USB 2.0) acoplada a um microcomputador (Intel Dual Core 4GB 750GB). Para a contagem de glomérulos por campo, foi utilizada a objetiva de magnificação final de 100x e, para a análise de parâmetros morfométricos, foi utilizada a objetiva de magnificação final de 400x.

Com relação à contagem dos glomérulos, foram capturadas aleatoriamente 30 imagens representativas de um corte renal de cada animal dos diferentes grupos experimentais. A contagem dos glomérulos foi realizada manualmente pelo mesmo observador, sem conhecimento dos grupos, registradas em planilhas do programa Excel, sendo retirada uma média aritmética por animal.

Para as análises dos seguintes parâmetros morfométricos: área do glomérulo e área da cápsula de Bowman, foram realizadas 20 imagens por corte renal de cada animal dos diferentes grupos experimentais, obtidas através de uma câmera acoplada ao microscópio. O programa utilizado foi o software de análise de imagens Image J. As áreas do glomérulo e da cápsula de Bowman foram obtidas através do contorno do glomérulo e a cápsula de Bowman à mão livre com ferramenta específica do Image J. Através da diferença da área da cápsula de Bowman e do glomérulo, obteve-se a área do espaço urinário. As imagens dos cortes

histológicos foram processadas e armazenadas referindo sua magnificação final de aumento em escala de pixels proporcional às propriedades de cada campo histológico selecionado.

Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 13.0. Foi realizado o cálculo das médias e desvios-padrão das variáveis estudadas. Para a determinação da presença ou não de distribuição normal, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação das médias das variáveis entre dois grupos, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes. Em todos os casos, foi considerado como nível de significância para a rejeição da hipótese nula um valor de $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%.

Considerações Éticas

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), protocolo: 23076.005924/2008-80, e aprovado uma vez que segue as normas recomendadas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Resultados

Com relação ao peso absoluto e relativo dos rins entre animais suplementados com L-arginina e os animais controle não houve diferença estatisticamente significativa, demonstrando que a suplementação com L-arginina não interfere no aumento do peso absoluto e relativo dos animais (Tabela 1). No entanto, ao se comparar o peso absoluto e relativo dos rins dos animais jovens e adultos entre os grupos controle e suplementado encontra-se diferença, onde a média do peso absoluto verificada foi de $(0,71 \pm 0,12g)$ e $(1,25 \pm 0,16g)$, respectivamente, em animais controle jovem e adulto ($p < 0,001$) e nos animais suplementados estes valores foram de $(0,75 \pm 0,11g)$ nos jovens e $(1,15 \pm 0,05g)$ nos adultos com $p < 0,001$ (Tabela 2). Para o peso relativo os resultados foram semelhantes aos do peso absoluto, apenas com valores maiores (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 – Efeito da suplementação de L-arginina sobre o peso absoluto e relativo renal e número de corpúsculos renais em ratos jovens e adultos

	Jovem		p	Adulto		p
	Controle	Arginina		Controle	Arginina	
	Média (DP)	Média (DP)		Média (DP)	Média (DP)	
Peso absoluto do rim (g)	0,71 (0,12)	0,75 (0,11)	0,633	1,25 (0,16)	1,15 (0,05)	0,262
Peso relativo do rim (g/100g do peso corporal)	0,53 (0,09)	0,57 (0,04)	0,468	0,42 (0,05)	0,40 (0,03)	0,606
Número de Corpúsculos renais/ campo	6,63 (1,89)	6,62 (2,02)	0,974	5,51 (1,89)	5,18 (1,76)	0,159

DP: Desvio padrão

No que se refere a contagem do número de glomérulos renais, a suplementação precoce com L-arginina não interferiu na média obtida entre animais dos grupos controle e suplementado (Tabela 1). Mas, ao se comparar a relação entre idades, grupo jovem e adulto, tanto o grupo controle quanto o suplementado mostrou diferenças nas médias de contagens de glomérulos renais. Nos animais jovens controle a média do número de glomérulos renais por 30 campos histológicos foi de (6,63±1,89 glomérulos renais) e nos adultos (5,51±1,89 glomérulos renais) havendo uma diminuição com significância estatística ($p < 0,001$). Esta diminuição no número de glomérulos renais também foi encontrada no grupo dos animais suplementados jovens (6,62±2,02) e adultos (5,18±1,76) ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação do peso absoluto e relativo renal e número de corpúsculos renais em diferentes idades experimentais (jovens e adultos) entre ratos controle e suplementados com L-arginina

	Controle		P	Arginina		P
	Jovem Média (DP)	Adulto Média (DP)		Jovem Média (DP)	Adulto Média (DP)	
Peso absoluto do rim (g)	0,71 (0,12)	1,25 (0,16)	0,002	0,75 (0,11)	1,15 (0,05)	<0,001
Peso relativo do rim (g/100g do peso corporal)	0,53 (0,09)	0,42 (0,05)	0,064	0,57 (0,04)	0,40 (0,03)	<0,001
Número de Corpúsculos renais/ campo	6,63 (1,89)	5,51 (1,89)	<0,001	6,62 (2,02)	5,18 (1,76)	<0,001

DP: Desvio padrão

Foram avaliados os parâmetros histomorfométricos do glomérulo renal, formado pela Cápsula de Bowman (cápsula glomerular) e pelo glomérulo. A área do espaço urinário que foi realizado baseado nas áreas da cápsula de Bowman e do glomérulo, é importante para verificar alterações minuciosas que ocorreram devido à suplementação com L-arginina em período precoce da vida e a manutenção destas alterações na vida adulta.

As áreas da cápsula de Bowman dos animais jovens, controle e suplementados, apresentaram as seguintes médias: $(454,88 \pm 89,53 \times 10^3 \mu\text{m}^2)$ e $(539,72 \pm 13,90 \times 10^3 \mu\text{m}^2)$ respectivamente, com $p < 0,001$. Para os animais do grupo adulto, foram verificadas as seguintes médias: controle $(553 \pm 109,61 \times 10^3 \mu\text{m}^2)$ e suplementado $(643,65 \pm 169,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2)$ com $p < 0,001$, evidenciando que a suplementação precoce com L-arginina promoveu um aumento significativo nas médias das áreas da cápsula de Bowman dos animais jovens e adultos (Tabela 3). No entanto, ao se avaliar a média da área do glomérulo no grupo de animais jovens controle $(345,41 \pm 74,6)$ e suplementados $(359 \pm 86,70)$ constata-se que o tratamento precoce com L-arginina não alterou a área do glomérulo em animais jovens ($p = 0,279$), diferentemente do ocorrido nos animais adultos onde o aumento da área glomerular em animais controle foi de $432,70 \pm 88,14$ e suplementados de $474,49 \pm 14$ ($p = 0,025$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito da suplementação de L-arginina sobre o peso absoluto e relativo renal e número de corpúsculos renais em ratos jovens e adultos

	Jovem		P	Adulto		P
	Controle	Arginina		Controle	Arginina	
	Média (DP)	Média (DP)		Média (DP)	Média (DP)	
Média da Área Glomerular ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	345,41 (74,60)	359,30 (86,70)	0,279	432,70 (88,14)	474,49 (14,00)	0,025
Média da Área da Cápsula de Bowman ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	454,88 (89,53)	539,72 (13,90)	<0,001	553,46 (109,61)	643,65 (169,50)	<0,001
Média da Área do Espaço urinário ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	109,47 (27,96)	180,42 (65,10)	<0,001	120,76 (38,89)	169,16 (64,13)	<0,001

DP: Desvio padrão

Nos animais jovens do grupo controle e suplementado com L-arginina houve um aumento da média da área do espaço urinário ($p < 0,001$), da mesma forma que nos animais adultos com e sem tratamento ($p < 0,001$) (Tabela 3), demonstrando que o tratamento precoce com a L-arginina aumentou a média da área do espaço urinário tanto em animais jovens, quanto nos animais adultos.

A tabela 4 apresenta os resultados da avaliação quanto ao efeito precoce do tratamento da L-arginina para se verificar sua repercussão até a idade adulta, comparando-se os grupos controle jovem e adulto e tratado jovem e adulto entre si. Verificou-se uma diminuição da média da área do espaço urinário nos animais jovens e adultos suplementados com L-arginina ($p < 0,001$), diferentemente do ocorrido entre os animais controle jovens e adultos, nos quais houve um aumento do mesmo ($p < 0,001$).

Tabela 4 – Parâmetros histomorfométricos de corpúsculos renais de ratos com e sem suplementação precoce de L-arginina, testando-se a hipótese de mudança destes parâmetros em animais jovens e adultos

	Controle		P	Arginina		P
	Jovem Média (DP)	Adulto Média (DP)		Jovem Média (DP)	Adulto Média (DP)	
Média da Área Glomerular ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	345,41 (74,60)	432,70 (88,14)	<0,001	359,30 (86,70)	474,49 (140,02)	<0,001
Média da Área da Cápsula de Bowman ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	454,88 (89,53)	553,46 (109,61)	<0,001	539,72 (138,97)	643,65 (169,50)	<0,001
Média da Área do Espaço urinário ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	109,47 (27,96)	120,76 (38,89)	0,037	180,42 (65,10)	169,16 (64,13)	0,272

DP: Desvio padrão

Discussão

No presente estudo não se observou diferença significativa no peso absoluto e relativo do rim direito entre os grupos controle e suplementados precocemente com L-arginina, demonstrando que a suplementação não influenciou no peso renal em animais da mesma faixa etária. Porém, em faixas etárias diferentes um aumento significativo foi observado tanto no peso absoluto quanto no relativo entre animais dos grupos controle (água destilada) e suplementados (L-arginina), confirmando o fato de que com o desenvolvimento do animal tanto o peso do órgão quanto o peso do animal aumentam.

Em relação à contagem de glomérulos renais, observa-se um declínio no número destas estruturas nos animais adultos em relação aos jovens independente da suplementação precoce com L-arginina. Mesmo entre os adultos do grupo controle e suplementados não houve diferença significativa na contagem de glomérulos renais, o que demonstra que a suplementação precoce não interfere no número de glomérulos renais, igualmente ao que foi constatado com os resultados do peso absoluto e relativo renal. Esses resultados confirmam que com o passar da idade ocorre uma diminuição fisiológica do número de glomérulos renais e da maioria das células do organismo (BENZ et al., 2010).

Em nosso estudo o período de administração de L-arginina ocorreu do 7º ao 35º dia pós-natal, próximo ao final do período crítico de desenvolvimento dos néfrons (nefrogênese), que em ratos ocorre predominantemente entre o 12º dia da gestação e o 10º dia após o nascimento (TAIN et al., 2010; MANNING & VEHASKARI, 2005). Baseando-se nessa informação, presume-se que o peso do rim e número de glomérulos não são influenciados se ofertada suplementação ao final da nefrogênese. Porém, a escolha do período de suplementação teve como objetivo questionar se as alterações causadas sobre estruturas microscópicas do rim perdurariam até a idade adulta.

Ao serem avaliados os parâmetros histomorfométricos, constatou-se que a média das áreas da cápsula de Bowman aumentou sob efeito da suplementação com L-arginina em animais jovens e adultos. Nos animais controle, verificou-se que, com o aumento da idade, houve um aumento da área do espaço urinário. Porém não foi observado o mesmo comportamento no grupo suplementado, em que a área do espaço urinário foi semelhante entre jovens e adultos. Isto provavelmente ocorreu devido ao aumento da área do glomérulo evidenciada apenas nos animais adultos suplementados.

A suplementação precoce com L-arginina em ratos adultos levou ao aumento nas médias das áreas do espaço urinário, do glomérulo e da cápsula de Bowman. Estudos evidenciam que a suplementação com L-arginina interfere na estrutura glomerular e na hemodinâmica renal, revertendo os efeitos deletérios causados, por exemplo, pela desnutrição intrauterina, insuficiência renal, diabetes mellitus e hipertensão arterial sobre o rim. No caso da desnutrição intrauterina, observou-se que a suplementação de L-arginina foi capaz de prevenir a lesão ou reverter da hipertrofia glomerular compensatória à redução do número de néfrons. Em consequência disso, a taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal aumentaram (ALVES et al., 2002; GIL et al., 2005).

Sabe-se que o excesso de proteínas ou sua deficiência em pacientes sem lesão renal pode desencadear sobrecarga renal e consequentemente alterações histológicas no rim (BEASLEY et al., 2014). Foi observado no presente estudo resultados semelhantes a este, no qual ratos adultos sadios expostos à suplementação precoce com L-arginina apresentaram aumento da média das áreas glomerulares, podendo sugerir hipertrofia ou aumento da espessura de sua membrana. Isso provavelmente ocorre porque a L-arginina eleva a disponibilidade de NO através da via NOS. O NO promove vasodilatação, regula a ativação plaquetária, inibe a proliferação celular do músculo liso e reduz a adesão leucocitária. Em

altas concentrações, o óxido nítrico é citotóxico, podendo levar a efeitos deletérios (EVANS et al., 2004).

Estudos demonstraram que a presença de hipertrofia glomerular está associada a situações patológicas como a hipertensão arterial sistêmica (WE et al., 2008). Com base nessa informação, percebemos que em nosso estudo a hipertensão arterial poderia ocorrer devido ao NO disponibilizado pela L-arginina, que interfere na espessura da membrana basal do glomérulo. Essa hipertrofia é capaz de lesar podócitos e endotélio, alterando a barreira de filtração e promovendo a deposição de macromoléculas no mesângio. Distúrbios hemodinâmicos, sobrecarga proteica, hipertensão arterial e redução de néfrons funcionantes com sobrecarga dos néfrons remanescentes podem causar hiperfiltração ou hipertensão em alças capilares, resultando em hipertrofia glomerular (MALHEIROS et al., 2011).

A hipertrofia glomerular constatada ao se analisar o efeito da suplementação precoce de L-arginina, foi evidenciada pelo aumento na média das áreas do espaço urinário e cápsula de Bowman que ocorre nos ratos jovens e se mantêm na idade adulta. Esses dados demonstram que a suplementação precoce com L-arginina tem efeito duradouro particularmente na área dos glomérulos.

Os efeitos da suplementação precoce da L-arginina observados pelo aumento da média da área glomerular, confirmam que a utilização desse aminoácido em períodos precoces da vida em organismos sadios podem trazer transtornos na hemodinâmica renal durante a vida adulta. É importante destacarmos a importância de mais estudos acerca da suplementação alimentar e que quando realizada em indivíduos sem alguma lesão renal aparente seja monitorada por profissionais da área médica e nutricional através de exames clínicos e quando presente alguma patologia que sua utilização seja ponderada e monitorada frequentemente.

Portanto, a suplementação de L-arginina não alterou o número de glomérulos e o peso absoluto e relativo do rim dos ratos estudados. Nos ratos adultos, a suplementação de L-arginina levou ao aumento da área glomerular. Esta alteração não foi evidenciada nos ratos jovens, sugerindo que, para esses parâmetros morfométricos, o efeito da L-arginina é tardio. As alterações morfométricas causadas pela suplementação da L-arginina perduram até a vida adulta dos ratos. Houve aumento do espaço urinário, da área do glomérulo, da área da cápsula de Bowman quando suplementados com L-arginina.

Novos estudos são necessários para complementar esses achados, sendo importante outras formas de avaliação do efeito da suplementação com L-arginina sobre a hemodinâmica renal, como exames laboratoriais bioquímicos – volume urinário, proteinúria, taxa de filtração glomerular, níveis pressóricos e imunohistoquímica.

Referências

- ALVES, G. M., et al. (2002). L-Arginine effects on blood pressure and renal function of intrauterine restricted rats. **Pediatric nephrology**, v.17, n. 10, p.856–62.
- BAYLES, C. (2006). Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2, p. 209-20.
- BENZ, K., & AMANN, K. (2010). Maternal nutrition, low nephron number and arterial hypertension in later life. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1802(12), p.1309–17.
- BROSNAN, M. E., BROSNAN, J. T. (2004). Renal Arginine Metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2791S-2795S.
- BROWN, L. D. et al. (2011). Maternal amino acid supplementation for intrauterine growth restriction. **Front Biosci (Schol Ed)**, v 1, p. 428-44.
- CHERLA, G., & JAIMES, E. A. (2004). Role of L-Arginine in the Pathogenesis and Treatment of Renal Disease. **Journal of Nutrition**, v. 9, p. 2801–2806.
- CHIARLA, C., GIOVANNINI, I., SIEGEL, J. H. (2005). Plasma arginine and correlations in trauma and sepsis. **Amino Acids**, v. 30, p. 81-86
- EVANS, R. W., et al. (2004). Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with L-arginine. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 15(9), p.534–9.
- FRAZÃO, M. F., MAIA, L. M. S. S., GUEDES, R. C. A. (2008). Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. **Neuroscience Letters**, v. 447, p. 26-30.
- GIL, F. Z., et al. (2005). Effects of intrauterine food restriction and long-term dietary supplementation with L-arginine on age-related changes in renal function and structure of rats. **Pediatric research**, v. 57, p.724–31.
- LUCAS, S. R. R., et al. (1997). Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. **Pediatric Nephrology**, v. 11, p. 719–723.

MALHEIROS, D. M. A.; CAVALCANTI, F. B. C.; TEESTAGROSSA, L. A.; DAVID, D. S. R. (2011). In: Boglioglio Patologia. Filho, G. B. Capítulo 15: Sistema Urinário. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro pp 1501.

MAIA, L. M. S. S., et al. (2006). L-arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats. **Brain Research**, v. 1072, p. 19 -25.

MANNING, J., VEHASKARI V. M. (2005). Postnatal modulation of prenatally programmed hypertension by dietary Na and ACE inhibition. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, p. R80-R84.

MESQUITA, F. F. (2010). Programação da ontogênese renal em um modelo de restrição proteica gestacional: estudos em cultura de metanefro e *in vivo*. Campinas, SP.

MONTEIRO, H. M. (2011). Differential effects of physical exercise and L-arginine on cortical spreading depression in developing rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, p. 112-8.

MORRIS JR., S. M. (2004) Enzymes of arginine metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 0022-3166/04, p. 2743-2746.

ORTIZ, M. C. (2014). Renal Response to L-Arginine in Diabetic Rats. A Possible Link between Nitric Oxide System and Aquaporin-2. **PLoS ONE** v. 9, e104923.

SCHELL, C., WANNER, N., & HUBER, T. B. (2014). Glomerular development-shaping the multi-cellular filtration unit. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. doi:10.1016/j.semcdb.2014.07.016

SCHNEIDER, R., et al (2003). L-Arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. **Kidney International**, v. 64, p. 216–25.

TAIN, YL, et al (2010). Effects of maternal L-citrulline supplementation on renal function and blood pressure in offspring exposed to maternal caloric restriction: the impact of nitric oxide pathway. **Nitric oxide**, v. 23, p. 34-41.

VOS, I. H. C., et al. Supplementation Improves Function and Reduces Inflammation in Renal Allografts L -Arginine, **Journal American Society Nephrology**, v. 12, p. 361–367, 2001.

WILMORE, D. (2004). Enteral and parenteral arginine supplementation to improve medical outcomes in hospitalized patients. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2863-2867.

WU, G. et al (2000). Arginine nutrition in development, health and disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 3, p. 59-66.

5 CONCLUSÃO

A suplementação de L-arginina não alterou o número de glomérulos e o peso absoluto e relativo do rim dos ratos machos jovens e adultos.

Nos ratos adultos, a suplementação de L-arginina levou ao aumento da área glomerular. Esta alteração não foi evidenciada nos ratos jovens, sugerindo que, para esses parâmetros morfométricos, o efeito da L-arginina é tardio.

As alterações morfométricas causadas pela suplementação da L-arginina perduram até a vida adulta dos ratos. Houve aumento do espaço urinário, da área do glomérulo, da área da cápsula de Bowman até a idade de 90 a 120 dias.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos estudos são necessários para melhor elucidar os nossos achados, para se avaliar o efeito da suplementação com L-arginina sobre a hemodinâmica renal, como: exames laboratoriais bioquímicos – volume urinário, proteinúria, taxa de filtração glomerular, níveis pressóricos e imunohistoquímica.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. A., et al. Chronic l-arginine treatment improves metabolic, cardiovascular and liver complications in diet-induced obesity in rats. **Food & function**, v. 4, n. 1, p.83–91, 2013.
- ALVES, G. M., et al. L-Arginine effects on blood pressure and renal function of intrauterine restricted rats. **Pediatric nephrology**, v.17, n. 10, p. 856–62, 2002.
- ALPERS, C. E. In: Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Robbins & Cotran. Capítulo 20: O Rim. Elsevier, Rio de Janeiro, 2004, pp 1000.
- ANNAVARAJULA, S. K., et al. The effect of L-arginine on arterial stiffness and oxidative stress in chronic kidney disease. **Indian journal of nephrology**, v.22, n. 5, p.340–6, 2012.
- ARGAMAN, Z., et. al. Arginine and nitric oxide metabolism in critically ill septic pediatric patients. **Critical Care Medicine**, v. 31, p. 591-597, 2003.
- BAYLES, C. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2, p. 209-20, 2006.
- BEASLEY, J. M., at al. Dietary protein intake and change in estimated GFR in the Cardiovascular Health Study. **Nutrition**, v.30, n. 7-8, 794–9, 2014.
- BENZ, K., & AMANN, K. Maternal nutrition, low nephron number and arterial hypertension in later life. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1802, n. 12, p.1309–17, 2010.
- BÖGER, R. H. The pharmacodynamics of L-arginine. Alternative therapies in health and medicine, **The Journal of Nutrition**, v. 20, n. 3, p. 48–54, 2007.
- BROSNAN, M. E., BROSNAN, J. T. Renal Arginine Metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2791S-2795S, 2004.
- BROWN, L. D. et al. Maternal amino acid supplementation for intrauterine growth restriction. **Front Biosci (Schol Ed.)**. v 1, p. 428-44, 2011.
- CANAVAL, M. F., et al. The influence of L-arginine on blood pressure, vascular nitric oxide and renal morphometry in offspring from diabetic mothers. **Pediatric Research**, v. 62, p. 145-149, 2007.
- CHERLA, G., JAIMES, E. A. Role of L -Arginine in the Pathogenesis and Treatment of Renal Disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 9, p. 2801–2806, 2004.
- CORSETTI, G., et al. Dietary supplementation with essential amino acids boosts the beneficial effects of rosuvastatin on mouse kidney. **Amino Acids**, 2014.
- DAFF, S. NO synthase: Structures and mechanisms. **Nitric Oxide**, v. 23, p. 1-11, 2010.

EVANS, R. W., et al. Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with L-arginine. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 15, n. 9, p.534–9, 2004.

FRANCO, M. C., et al. Micronutrient prenatal supplementation prevents the development of hypertension and vascular endothelial damage induced by intrauterine malnutrition. **Life Sciences**, v. 85, p. 327–333, 2009.

FRAZÃO, M. F., MAIA, L. M. S. S., GUEDES, R. C. A. Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. **Neuroscience Letters**, v. 447, p. 26-30, 2008.

GIL, F. Z., et al. Effects of intrauterine food restriction and long-term dietary supplementation with L-arginine on age-related changes in renal function and structure of rats. **Pediatric research**, v. 57, p.724–31, 2005.

GOUVÊA, S. A, et al. Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 36, n. 7, p. 943–9, 2003.

GREEN, A. S. LINESAND, S. W. Remembering development – epigenetic responses to fetal malnutrition. **The Journal of Physiology**, v. 588.9, p. 1379–1380, 2010.

HUGHSON, M., et al. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. **Kidney International**, v. 63, p. 2113–22, 2003.

INGELFINGER, J.R. Is microanatomy destiny? **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 99-100, 2003.

JUNIEN, C. Impact of diets and nutrients/drugs on early epigenetic programming. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 29, p. 359-365, 2006.

LANGLEY-EVANS, S. C., WELHAM, S. J. M., & JACKSON, A. A. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. **Life Sciences**, v. 64, p. 965-974, 1999.

LUCAS, S. R. R., et al. Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. **Pediatric Nephrology**, p. 719–723, 1997.

MALHEIROS, D. M. A.; CAVALCANTI, F. B. C.; TEESTAGROSSA, L. A.; DAVID, D. S. R.. In: Boglioglio Patologia. Filho, G. B.. Capítulo 15: Sistema Urinário. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2011, pp 1501.

MAIA, L. M. S. S., et al. L-arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats. **Brain Research**, v. 1072, p. 19 -25, 2006.

MAÑALICH, R., et al. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. **Kidney international**, v. 58, n. 2, p. 770–3, 2000.

MANNING, J., VEHASKARI V. M. Postnatal modulation of prenatally programmed hypertension by dietary Na and ACE inhibition. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, p. R80-R84, 2005.

MARTENS, C. R., et al. Voluntary Wheel Running Augments Aortic L-Arginine Transport and Endothelial Function in Rats With Chronic Kidney Disease. *American journal of physiology*. **Renal physiology**, 2014.

MORRIS, S. M. JR. Enzymes of Arginine Metabolism. **The Journal of nutrition**, v. 134, p. 2743S-2747S, 2004.

MONTEIRO, H. M. Differential effects of physical exercise and L-arginine on cortical spreading depression in developing rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, p. 112-8, 2011.

MURAWSKI, I. J., et al. The relationship between nephron number, kidney size and body weight in two inbred mouse strains. **Organogenesis**, v. 6, n. 3, p. 189–94, 2010.

ORTIZ, M. C. Renal Response to L-Arginine in Diabetic Rats. A Possible Link between Nitric Oxide System and Aquaporin-2. **PLoS ONE** v. 9, e104923, 2014.

PAN, M., et al. Arginine transport in catabolic disease states. **The Journal of nutrition**, v.134, p 2826-2829, 2004.

PAIXÃO, A. D. O., et al. Regional Brazilian Diet-Induced Low Birth Weight Is Correlated with Changes in Renal Hemodynamics and Glomerular Morphometry in Adult Age. *Biology of the Neonate*, v. 80, p. 239-246, 2001.

PETERS, H., et al. L-arginine supplementation accelerates renal fibrosis and shortens life span in experimental lupus nephritis. **Kidney International**, v. 63, n. 4, p. 1382–92, 2003.

PINTO, L. M. O. Revisão/Atualização em Nefrologia clínica: células mesangiais em matriz mesangial: sua interação mediando o processo de cronificação da lesão glomerular. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 20, p. 178-185, 1998.

RHODEN, E. L., et al. Effects of l-arginine and l-name on renal ischemia - reperfusion in rats. **Brazilian Journal of Urology**, v. 27, p. 78-83, 2001.

SECO S, MATIAS A. Origem fetal das doenças do adulto: revisitando a teoria de Barker. **Acta Obstetrica e Ginecologica Portuguesa**, v. 3, n. 3, p. 158-168, 2009.

SCHNEIDER, R., et al. L-Arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. **Kidney International**, v. 64, p. 216–25, 2003.

TAIN, YL, et al. Effects of maternal L-citrulline supplementation on renal function and blood pressure in offspring exposed to maternal caloric restriction: the impact of nitric oxide pathway. **Nitric oxide**, v. 23, p. 34-41, 2010.

VIEIRA-FILHO, L. D., Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 505, p. 91-97, 2011.

VOS, I. H. C., et al. Supplementation Improves Function and Reduces Inflammation in Renal Allografts L -Arginine, **Journal American Society Nephrology**, v. 12, p. 361–367, 2001.

WU, G. et al. Arginine nutrition in development, health and disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 3, p. 59-66. 2000.

WU, L., MORRIS, S. M. JR. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, v. 336, p. 1-17, 1998.

WESSELING, S., et al. Consequences of perinatal treatment with L-arginine and antioxidants for the renal transcriptome in spontaneously hypertensive rats. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 458, n. 3, p. 513–24, 2009.

ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais da UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 04 de maio de 2010

Ofício nº 267/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profa. Luciana Maria Silva de Seixas Maia**
Departamento de Histologia e Embriologia – CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 005924/2008 - 80

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"INTERAÇÃO DA L-ARGININA E DO EXERCÍCIO FÍSICO DURANTE O DESENVOLVIMENTO: ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE ÓRGÃOS EM RATOS JOVENS E ADULTOS."**

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental 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 CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

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

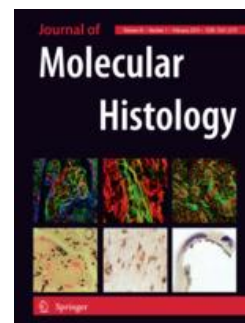
Atenciosamente,

Observação:

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição
Animais: Ratos; Wistar; ambos os sexos; com 35 - 45/ 90 -120 dias de vida; Número de animais previsto no protocolo: 80 animais.
O Projeto será realizado com órgãos provenientes dos animais do processo intitulado, **Interação L- arginina e atividade física durante o desenvolvimento do sistema nervoso: Análise da depressão alastrante cortical em ratos jovens e adultos (Aprovado pela CEUA sob Ofício nº51/08).**


Prof. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

Anexo B - Instruções aos autores da revista Journal of Molecular Histology



JOURNAL OF MOLECULAR HISTOLOGY

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

ISSN: 1567-2387

IMPACT FACTOR

2013: 1.979 ©Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

Editor –in Chief

Brian Key

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- The text of a research paper should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest, and References.
- Materials and Methods must include statement of Human and Animal Rights.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

TABLES

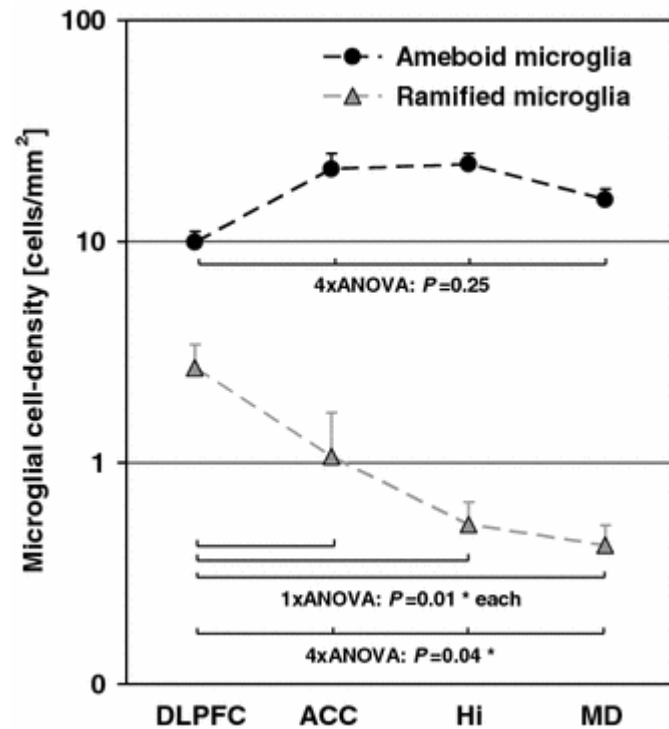
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

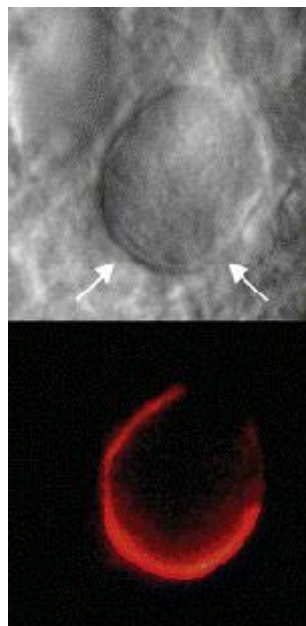
Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.
- Line Art



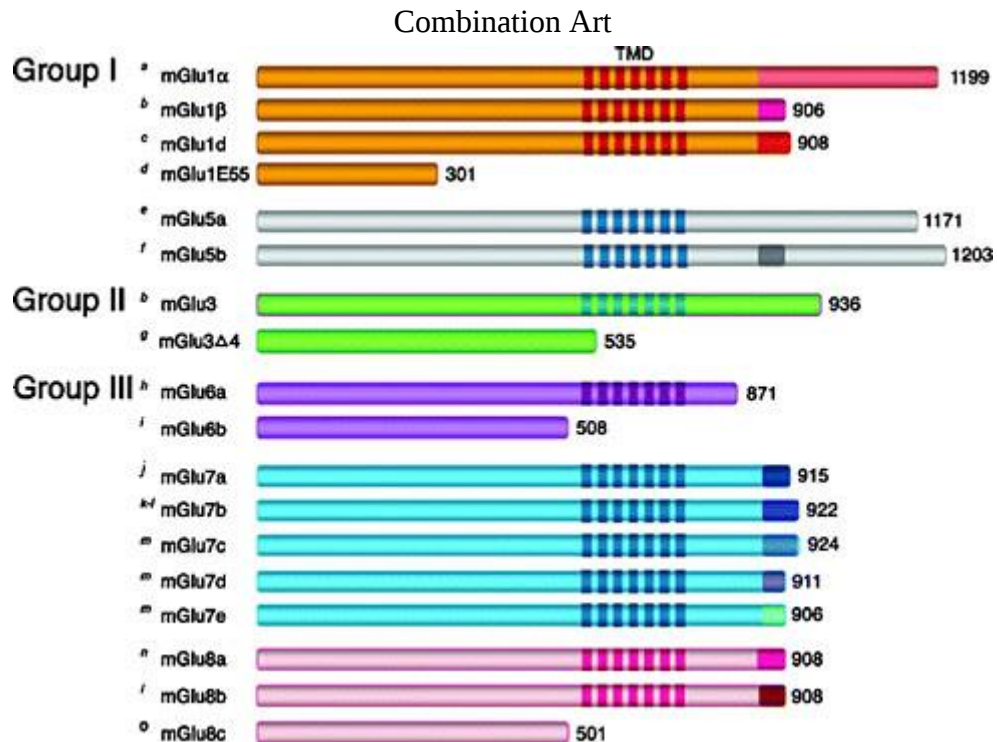
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.
- Color Art
- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

- In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.
- Audio, Video, and Animations
- Always use MPEG-1 (.mpg) format.
- Text and Presentations
- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).
- Specialized Formats
- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.
- Collecting Multiple Files
- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.
- Numbering
- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.
- Captions
- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.
- Processing of supplementary files
- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.
- Accessibility
- In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that
- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- [Edanz English editing for scientists](#)

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

- [Edanz English editing for scientists](#)

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

- [理文编辑](#)

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンググループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

- [エダンググループジャパン](#)

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및 신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

- [Edanz Editing Global](#)

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- [Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.