

RILENE MARIA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO

EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO SOBRE OS RECEPTORES
MUSCARÍNICOS E A ATIVIDADE ACETILCOLINES-
TERÁSICA EM CÉREBRO DE RATOS

Tese que apresenta ao Departamento de
Fisiologia e Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

FG-00002649-8

Fortaleza

1990



ENCUESTA COOP

BES

REL

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº.	1119
	08 / 11 / 95

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº.	512672
	01 / 30 / 96

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Rilene Maria de Oliveira Figueiredo

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09.02.90

Profa.Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
Orientadora

Prof.Dr. Carlos Maurício de Castro Costa

Prof.Dr. José Afonso Bruno

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado às pessoas do meu maior apreço, aquelas que têm participado mais de perto da minha vida, contribuindo, direta ou indiretamente, com o maior legado para a minha formação moral e ideológica:

meu pai, Ricardo Cícero de Oliveira,
minha mãe, Marlene Fraga de Oliveira,
meus esposo, Bonald Cavalcante de Figueiredo,
meus filhos, Francisco Ricardo de Oliveira Figueiredo e Mirna Maria de
Oliveira Figueiredo,
meus irmãos, Eneida Cláudia de Oliveira e Ricardo Cícero de Oliveira Filho, e
meus tios, Maurício José Borba Fraga e Marcelo Borba Fraga.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela orientação e confiança que dispensou durante a realização deste trabalho, pelo esforço para adquirir o material de pesquisa e pela sinceridade que demonstrou durante a nossa convivência no laboratório.

Ao Prof. José Afonso Bruno, do Departamento de Morfologia da UFCE, pela orientação na identificação e na técnica de dissecação das estruturas cerebrais e por ter aceito a cansativa tarefa de corrigir este trabalho, participando da banca examinadora da defesa de tese.

Ao Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa, por aceitar participar da banca examinadora da defesa de tese e contribuir com sugestões valiosas.

Ao Prof. Dr. Ignácio Hernan Salsedo, do Departamento de Energia Nuclear da UFPE, pelas sugestões na determinação da radioatividade lida pelo contador de cintilação.

À Profa. Cacilda Vasconcelos Castelo Branco, do Departamento de Estatística da UFPE, pela orientação na aplicação dos testes estatísticos.

Ao Prof. Bonald Cavalcante de Figueiredo, meu esposo, pelas sugestões durante o trabalho de dissecação das áreas cerebrais de ratos, pelo companherismo durante as noites mal dormidas em que precisei trabalhar e pela dedicação e presteza ao fornecer referências bibliográficas atualizadas.

A Ricardo e Marlene, meus pais, e a Eneida, minha irmã, pela total dedicação que dispensaram a mim e aos meus filhos e que me permitiu realizar este trabalho.

A Ricardo, meu irmão, agradeço pela tão valiosa ajuda que deu a esta tese e a minha vida, sempre encontrando tempo para refletir e usar da sabedoria, e que tem exaustivamente tentado abrir novos horizontes além das fronteiras científicas e filosóficas.

Ao Sr. Raimundo das Chagas Marques, pela pronta assistência nos trabalhos de laboratório.

Ao Sr. Sílvio Alves Costa, pela sua boa vontade e eficiência ao digitar esta tese.

À Sra. Ana Rodrigues de Souza, pelo acolhimento em seu lar, quando da minha volta à Fortaleza para realizar o trabalho de digitação da tese.

A todos os colegas do Curso de Mestrado, em especial a Farideh Rabbani Nourani, pela solidariedade nas horas difíceis.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Sobre desnutrição proteico-calórica e sua influência no sistema nervoso central	1
1.2 - Sobre receptores colinérgicos muscarínicos.....	7
1.3 - Sobre acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7).....	10
1.4 - Objetivos do trabalho.....	12
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1 - Animais.....	13
2.2 - Dietas.....	13
2.3 - Dissecção das áreas cerebrais (hipocampo, córtex motor, córtex somatosensorial e núcleos da base).....	14
2.4 - Determinação da densidade e da afinidade dos receptores muscarínicos	15
2.4.1 - Princípio.....	15
2.4.2 - Material.....	16
2.4.3 - Método.....	17
2.4.4 - Cálculo da densidade dos receptores e da constante de dissociação no equilíbrio.....	17
2.5 - Determinação da atividade acetilcolinesterásica.....	19
2.5.1 - Princípio.....	19
2.5.2 - Material.....	19
2.5.3 - Método.....	20
2.5.4 - Cálculo da atividade acetilcolinesterásica.....	20
2.6 - Dosagem de proteína.....	21
2.6.1 - Princípio.....	21

2.6.2 - Material.....	21
2.6.3 - Método.....	22
2.6.4 - Cálculo da quantidade de proteína.....	22
2.7 - Pesagem dos animais.....	22
2.8 - Análise estatística.....	22
3 - RESULTADOS.....	29
3.1 - Efeitos da desnutrição sobre a densidade de receptores muscarínicos centrais.....	29
3.2 - Efeitos da desnutrição sobre a atividade acetilcolinesterásica em 4 áreas cerebrais.....	30
3.3 - Efeitos da desnutrição sobre a quantidade de proteína em 4 áreas cerebrais.....	31
3.4 - Efeitos da desnutrição sobre o fenótipo e o peso dos animais.....	31
4 - DISCUSSÃO.....	52
5 - CONCLUSÕES.....	58
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
7 - APÊNDICE.....	77

LISTA DE FIGURAS

2.3.1 - Cortes frontais do cérebro de rato.....	27
2.3.2 - Vistas lateral e dorsal do cérebro de rato.....	28
3.1.1 - Efeito da desnutrição sobre a densidade de receptores muscarínicos em hipocampo e núcleos da base de ratos.....	42
3.1.2 - Efeito da desnutrição sobre a densidade de receptores muscarínicos em 4 áreas cerebrais de ratas.....	43
3.1.3 - Gráfico de Eadie-Hofstee das ligações específicas de [³ H]NMS em hipocampo de ratas desnutridas e controles, com idades de 12-19 dias e 5-8 meses.....	44
3.1.4 - Efeito da desnutrição sobre a densidade de receptores muscarínicos em córtices motor e somatosensorial de ratos.....	45
3.1.5 - Gráfico de Eadie-Hofstee das ligações específicas de [³ H]NMS no córtex motor de ratas desnutridas e controles, com idades de 12-19 dias e 5-8 meses.....	46
3.1.6 - Gráfico de Eadie-Hofstee das ligações específicas de [³ H]NMS no córtex somatosensorial de ratas desnutridas e controles, com idades de 12-19 dias e 5-8 meses.....	47
3.1.7 - Gráfico de Eadie-Hofstee das ligações específicas de [³ H]NMS em núcleos da base de ratas desnutridas e controles, com idades de 12-19 dias e 5-8 meses.....	48
3.2 - Efeito da desnutrição sobre a atividade acetilcolinesterásica de 4 áreas cerebrais de ratos em função da idade.....	49
3.4.1 - Aspectos de ratas, desnutrida e controle, em idade neonatal.....	50
3.4.2 - Aspectos de ratas, desnutrida e controle, com idade de 5 meses.....	51
7 - Programa de regressão não linear da função da hipérbole retangular para aplicação em estudos de binding.....	77

LISTA DE TABELAS

Página

2.2.1 - Composição centesimal da ração utilizada no grupo experimental.....	24
2.2.2 - Composição da ração Labina 5001.....	25
2.5.3 - Protocolo utilizado na determinação da atividade de acetilcolinesterásica.....	26
2.6.3 - Protocolo utilizado na dosagem de proteínas.....	26
3.1.1 - Efeito da desnutrição sobre a densidade de receptores colinérgicos muscarínicos em 4 áreas cerebrais de ratas.....	33
3.1.2 - Efeito da desnutrição sobre a densidade de receptores colinérgicos muscarínicos em 3 áreas cerebrais de ratas.....	34
3.1.3 - Efeito da desnutrição sobre a densidade máxima (Bmax) e a afinidade (Kd) dos receptores muscarínicos em 4 áreas cerebrais de ratas. Dados obtidos a partir dos gráficos de Eadie-Hofstee...	35
3.1.4 - Efeito da desnutrição sobre o Bmax e o Kd de 4 áreas cerebrais de ratas. Dados obtidos a partir do programa de regressão não linear da função da hipérbole retangular.....	36
3.2.1 - Efeito da desnutrição sobre a atividade acetilcolinesterásica em 4 áreas cerebrais de ratas.....	37
3.2.2 - Efeito da desnutrição sobre a atividade acetilcolinesterásica em 3 áreas cerebrais de ratos.....	38
3.3.1 - Efeito da desnutrição sobre o conteúdo de proteína de 4 áreas cerebrais de ratas.....	39
3.3.2 - Efeito da desnutrição sobre o conteúdo de proteína de 4 áreas cerebrais de ratos.....	40
3.4 - Efeito da desnutrição sobre o peso corporal de ratos.....	41

RESUMO

O sistema colinérgico muscarínico central desempenha um papel modulatório importante em várias funções cerebrais, tais como, aprendizagem, memória e controle dos movimentos (SMART e DOBBING, 1971;SOBOTKA et al., 1974; KARCZMAR, 1978, apud GREMO et al., 1987). Há muitas evidências sobre retardo do desenvolvimento motor e mental em crianças desnutridas, as quais atuam precariamente em testes cognitivos e exibem déficits de memória e de percepção (MONCKBERG, 1969, e KLEIN et al., 1969, apud MONCKBERG, 1975). Nos casos de subnutrições, moderada à severa, quase sempre resultaram permanentemente em déficits cognitivos com redução do QI. Estas ocorrências, bastante comuns no Brazil e países do terceiro mundo, nos levaram à estudar mudanças no sistema colinérgico central durante e após o desenvolvimento cerebral, usando um modelo equivalente de animal subnutrido. Fizemos determinações da densidade e afinidade dos receptores muscarínicos e da atividade acetilcolinesterásica em regiões cerebrais ricas em terminais colinérgicos: hipocampo, córtex motor, córtex somatosensorial e núcleos da base (que corresponde ao neostriatum ou caudado-putâmen). Os animais controles e desnutridos (recebendo dieta especial desde a vida intra-uterina), de ambos os sexos, foram sacrificados aos 12-19 dias ou 5-8 meses de idade. Assim, uma dieta hipoproteica e hipocalórica foi utilizada para desnutrir os animais, foram feitos ensaios de binding, utilizando [³H]NMS como radioligante (DOMBROWSKI et al., 1983) e a atividade acetilcolinesterásica foi determinada por método colorimétrico (ELLMAN et al., 1961). Nossos resultados mostraram que não ocorreu alteração significativa na densidade dos mAChR nem na atividade acetilcolinesterásica na presença de desnutrição, em nenhuma das áreas e grupos estudados, com exceção do córtex motor de ratos com 12-19 dias de vida, onde houve um aumento significativo na densidade desses receptores. No córtex motor também ocorreu diminuição significativa da atividade acetilcolinesterásica nos animais machos com 5-8 meses de idade em relação aos seus respectivos controles. Em ratas desnutridas com idade de 5-8 meses, houve apenas uma tendência para a diminuição da densidade dos mAChR em hipocampo e córtex (motor e somatosensorial). A desnutrição aumentou a afinidade dos mAChR em todas as áreas e idades estudadas, exceto nos núcleos da base de ratos neonatos, onde o K_d não foi diferente do encontrado para os controles da

mesma idade. Com o passar da idade, apenas no grupo controle, ocorreu aumento significativo da densidade dos mAChR em hipocampo de ratos de ambos os sexos e nas regiões corticais motora e somatosensorial dos animais machos. No grupo desnutrido, houve um aumento na densidade, porém não estatisticamente significativo, em função da idade apenas no hipocampo das ratas. A atividade acetilcolinesterásica aumentou em função da idade no hipocampo dos animais desnutridos e controles, de ambos os sexos, no córtex motor das ratas desnutridas e dos machos controles, e no córtex somatosensorial dos animais machos desnutridos e controles. A distribuição dos mAChR ligados pela [³H]NMS coincidiu com o que já foi demonstrado (EL-FAKAHANY et al., 1986), mostrando uma maior densidade no neostriatum e depois em ambas regiões corticais e no hipocampo. A atividade acetilcolinesterásica apresentou distribuição paralela à dos receptores muscarínicos. Neste estudo podemos concluir que o sistema colinérgico é muito tolerante à desnutrição proteico-calórica, enquanto outros parâmetros bioquímicos e estruturais de outros sistemas são facilmente alterados. Um mecanismo compensatório contra os efeitos prejudiciais da desnutrição sobre o sistema colinérgico central poderia ser uma explicação para o aumento observado na afinidade de seus receptores com o passar da idade.

ABSTRACT

The central muscarinic cholinergic system plays an important modulatory role in a variety of cerebral activities, such as learning, memory and motor functions (SMART e DOBBING, 1971; SOBOTKA et al., 1974; KARZMAR, 1978, apud GREMO et al., 1987). There is a large body of evidence on mental and motor retardation resulting from undernourishment in children, who perform poorly in cognitive tests and display impaired capacity for memory and perception (MONCKBERG, 1969, e KLEIN et al., 1969, apud MONCKBERG, 1975). In cases with moderate to severe undernourishment during cerebral development, a cognitive impairment with low IQ is usually permanent. These clinical findings, very common in Brazil and in third world countries, encouraged us to investigate possible changes in the cerebral cholinergic system using an equivalent animal model of malnutrition. We analyzed the density and affinity of muscarinic receptors, as well as the enzymatic activity of acetylcholinesterase in well known brain regions with rich cholinergic innervation: hippocampus, motor and somatosensorial cortices and basal forebrain nuclei (which correspond to caudate and putamen). To this end, male and female control animals and undernourished ones (those receiving a special diet since the beginning of their intrauterine life) were sacrificed either at 12-19 days or at 5-8 months of age. A diet with very low amounts of protein and calory was given to the animals, radioligand binding assays to assess muscarinic receptors (mAChR) were performed using ³HNMS (DOMBROWSKI et al., 1983) and the acetylcholinesterase activity was determined using a colorimetric assay (ELLMAN et al., 1961). Our results revealed that undernutrition did not cause any statistically significant modification in the total amount of mAChR neither in the activity of acetylcholinesterase, except in the motor cortex of pups (12-19 days of age), where an increase ($p < 0.05$) in the density of mAChR was noted relative to naive controls. In the motor cortex of 5-8 month-old male rats, we observed an decrease in acetylcholinesterase activity in undernourished animals as compared to controls ($p < 0.05$). Undernourished female rats, 5-8 months of age, exhibited only a tendency to a diminished density of mAChR in hippocampus and cortex (motor and somatosensorial). Undernourishment increased the affinity of mAChR in all studied brain regions, except in basal nuclei of neonates which had an unchanged Kd. Only in control animals, the density of mAChR in the hippocampus of male and female

rats increased with age, similar increase occurred in the motor and somatosensorial cortices of male rats. In undernourished female rats occurred an increase with age in hippocampal mAChR, however, this change was not statistically significant. Acetylcholinesterase activity increased with age in the hippocampus of all undernourished and control animals, in the motor cortex of undernourished female and naive male animals and in the somatosensorial cortex of all male control and undernourished rats. In agreement with previous study (EL-FAKAHANY et al., 1986), the density of mAChR was highest in the neostriatum and lower in the studied cortices and hippocampus. Acetylcholinesterase activity values correlated with those of mAChR density. In conclusion, our results suggest that the central cholinergic system may still tolerate severe undernourishment while many other reported biochemical and morphological parameters are easily affected. A compensatory mechanism in central cholinergic undernourished rodents could be one explanation for the observed increase in affinity of mAChR with age.

1 - INTRODUÇÃO

Numa primeira parte deste capítulo procurar-se-á conscientizar o leitor sobre a importante influência da desnutrição proteico-calórica (DPC) sobre o sistema nervoso, em particular, sobre o sistema colinérgico. Numa segunda e terceira parte, será feita uma revisão bibliográfica detalhada sobre os receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR) e a atividade acetilcolinesterásica (AChE), parâmetros indispensáveis para o funcionamento desse sistema colinérgico. Finalmente, serão definidos os objetivos principais deste trabalho.

1.1 - Sobre desnutrição proteico-calórica e sua influência no sistema nervoso

Uma revisão detalhada sobre a conceituação da DPC em função de sua evolução histórica e manifestações clínicas no homem, foi feita por COUTINHO (1978). No entanto, a lembrança de imediato da imagem da criança nordestina, um modelo de DPC tão comumente encontrado entre nós, ajuda-nos a compreender logo sobre o que estamos tratando. Este mal, antes de tudo, social, é sabidamente endêmico num meio onde campeiam o baixo status sócio-econômico, a falta de educação, as precárias condições sanitárias e as infecções recorrentes (YUNES, 1976).

MONCKEBERG (1975) chamou a atenção para o fato de que crianças de camadas sócio-econômicas mais baixas apresentaram deficiência de crescimento e de maturação de vários órgãos, inclusive do cérebro. Ao mesmo tempo, uma alta frequência de retardo do desenvolvimento mental e motor foi observada nessas crianças desnutridas (MONCKEBERG, 1969, apud MONCKEBERG, 1975). Prejuízo da memória recente e da capacidade perceptiva dessas crianças, foi encontrado por KLEIN e colaboradores (1969) apud MONCKEBERG (1975). No entanto, em termos fisiopatológicos, os determinantes reais desse retardo do desenvolvimento, quer permanente ou não durante toda a vida dessas crianças, não poderão ser conhecidos sem que modelos de animais experimentais desnutridos e a medição de seus parâmetros bioquímicos e estruturais comecem a esboçar os mecanismos neuropatológicos que regem esse comportamento.

A começar com o peso do cérebro de animais experimentais, vários são os trabalhos que mostraram diminuição desse parâmetro na presença de desnutrição (SERENI et al., 1966; CHASE et al., 1967; GUTHRIE e BROWN, 1968; BASS et al.,

1970; DOBBING e SANDS, 1971; ADLARD e DOBBING, 1972; WEST e KEMPER, 1976; DAVIES e KATZ, 1983; TIRAPEGUI e DE ANGELIS, 1984; GUEDES, 1985). Esses autores, no entanto, observaram que a deficiência de peso do cérebro de animais desnutridos foi proporcionalmente menor que a deficiência de peso corporal desses mesmos animais quando comparados com os respectivos pesos de animais eutróficos, e chamaram isso de fenômeno de sparing, sugerindo que o cérebro tenha sido mais poupado dos efeitos prejudiciais da desnutrição que outros órgãos.

O cérebro de rato cresce rapidamente até o 15º dia de vida pós-natal, principalmente por aumento do número de células; a partir de então, o processo de divisão celular sofre desaceleração e o crescimento se faz predominantemente por aumento do tamanho dessas células (WINICK e NOBLE, 1965, apud WIDDOWSON, 1970). Esse mesmo comportamento de rápida hiperplasia e completa diferenciação nas 3 primeiras semanas de vida, foi observado também no córtex somatosensorial (BASS et al., 1970) e no córtex visual do cérebro desses animais (SALAS et al., 1974), assim como no hipocampo (JORDAN et al., 1982) e cerebelo (GRIFFIN et al., 1977).

Vasta literatura demonstrou haver diminuição da quantidade de DNA tanto no cérebro como um todo como em diversas áreas cerebrais de animais desnutridos, indicando um menor número de células nesses locais quando a desnutrição ocorreu durante o período de estirão de crescimento desse órgão (WINICK e NOBLE, 1966; GUTHRIE e BROWN, 1968; BASS et al., 1970; DOBBING e SANDS, 1971; GRIFFIN et al., 1977; CELEDON et al., 1979; MORGAN e NAISMITH, 1982; TIRAPEGUI e DE ANGELIS, 1984). O efeito da desnutrição sobre a quantidade de DNA cerebral, no entanto, pareceu não ser cumulativo através das gerações (ZAMENHOF e MARTHENS, 1978).

Um menor tamanho das células cerebrais, evidenciado por técnicas histoquímicas ou por diminuição da relação proteína/DNA, foi verificado por alguns autores quando a desnutrição esteve presente desde o período embrionário (WEST e KEMPER, 1976; MORGAN e NAISMITH, 1982; TIRAPEGUI e DE ANGELIS, 1984). Tendo sido a desnutrição instalada somente no período neonatal, não foi observada diminuição do tamanho das células cerebrais (WINICK e NOBLE, 1966).

Foi encontrada uma menor diferenciação celular em córtex somatosensorial quando a desnutrição ocorreu apenas durante o período de

amamentação (BASS et al., 1970). No entanto, no cérebro como um todo, não foi observada diminuição da relação RNA/DNA mesmo quando a desnutrição ocorreu desde a vida intra-uterina (TIRAPEGUI e DE ANGELIS, 1984).

PATEL (1983) chamou a atenção para o fato de que a diminuição do número de células no cérebro de ratos desnutridos foi proporcionalmente menor que a diminuição da síntese de DNA, e tentou explicar o fenômeno de sparing cerebral com base nessa discrepância. Segundo citação desse autor, foi evidenciado nos sítios germinativos do prosencéfalo, cerebelo e hipocampo, como característica peculiar às células cerebrais, um prolongamento proporcionalmente maior da fase S de síntese de DNA que da duração de todo o ciclo celular, que não se mostrou tão diminuído como em outros órgãos, graças a uma severa diminuição da fase G1 desse ciclo. Esse autor lembrou a importância dos eventos que ocorrem nessa fase, a ponto de serem considerados críticos para a completa expressão das diversas funções de algumas células.

A quantidade total de proteína cerebral foi menor nos ratos desnutridos que receberam a mesma dieta materna, hipoproteica e desbalanceada, após o desmame, que em ratos cuja desnutrição foi causada por uma dieta hipoproteica e balanceada (TIRAPEGUI e DE ANGELIS, 1984); entretanto, não foi observada nenhuma alteração do conteúdo proteico cerebral quando os ratos experimentais, desnutridos às custas dessa dieta hipoproteica e balanceada, foram comparados com os ratos controles, adequadamente alimentados (SOBOTKA et al., 1974; TIRAPEGUI e DE ANGELIS, 1984; JOHNSON e DUNHAM, 1988). Por outro lado, em ratos desnutridos de até 24 dias de vida, foi verificada uma redução do conteúdo cerebral de glicoproteínas de cerca de 25% durante todo o período em que receberam dieta semi-sintética, pobre em caseína (MORGAN e NAISMITH, 1982). A quantidade de proteína S100, específica do cérebro e rica em ácido aspártico e ácido glutâmico, estava diminuída no córtex visual de ratos desnutridos e aumentada no córtex somatosensorial desses mesmos animais; em hipocampo, não foi observada nenhuma alteração dessa proteína na presença de desnutrição (HYDÉN e LANGE, 1975).

Uma diminuição da quantidade de colesterol cerebral (GUTHRIE e BROWN, 1968; DOBBING e SANDS, 1971; SOBOTKA et al., 1974; REDDY e SASTRY, 1978; CELEDON et al., 1979) e da síntese de sulfatídeo, um galactocerebrosídeo encontrado em grande quantidade na mielina (CHASE et al., 1967),

bem como um menor número de células gliais responsáveis pela formação de mielina (BASS et al., 1970; MORGAN e NAISMITH, 1982), têm sido encontrados em animais desnutridos e responsabilizados pelo prejuízo da propagação do impulso nervoso nesses animais (MORGAN e NAISMITH, 1982). Entretanto, a nível de sistema nervoso periférico, CORNBLATH e BROWN (1988) encontraram diminuição significativa do número de fibras mielinizadas de grosso calibre em ratos com idade de 4 semanas, desnutridos desde o nascimento, sem que fosse prejudicado, no entanto, o padrão de medidas eletrofisiológicas da função desses nervos.

GUEDES (1985) relatou que ratos precocemente desnutridos demoraram mais tempo para atingir o padrão adulto normal de sinais elétricos cerebrais, registrados por eletroencefalogramas, além de terem apresentado potenciais evocados com respostas mais lentas e menor velocidade de condução dos potenciais de ação ao longo dos prolongamentos das células nervosas.

A transmissão do impulso nervoso através dos processos sinápticos também pareceu estar bastante prejudicada com a desnutrição. Assim, foram observados uma ausência de dendritos apicais no córtex somatosensorial (BASS et al., 1970) e um menor número de espículas dendríticas nas células piramidais dos córtices frontal e occipital de ratos (SALAS et al., 1974). O córtex frontal, a exemplo do córtex parietal e do hipocampo, também apresentou retardo no processo de maturação neurofibrilar (VIANA et al., 1988). Uma diminuição de 30-40% na relação sinapse/neurônio, foi encontrada por THOMAS e colaboradores (1980).

Em se tratando de neurotransmissores, a maioria dos autores mostraram que a restrição proteica causou aumento dos níveis de serotonina (5-HT) cerebral, de triptófano (l-Trp), seu aminoácido precursor, e do ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), seu principal metabólito, sugerindo que o sistema serotoninérgico tenha sido ativado com a desnutrição (SOBOTKA et al., 1974; STERN et al., 1975; RESNIK e MORGANE, 1984; PETERS e HARPER, 1985; HERNÁNDEZ et al., 1989). O aumento dos níveis plasmáticos de triptófano livre, secundário a uma diminuição da albumina plasmática que se liga a esse aminoácido e compete com um suposto sistema de transporte específico de l-Trp para o interior do cérebro, foi uma hipótese levantada para justificar o aumento da serotonina cerebral (HERNÁNDEZ et al., 1989). Estes autores também não encontraram aumento concomitante dos níveis plasmáticos de outros

aminoácidos neutros (LNAA: Phe, Val, Leu, Tyr e Ile) que competem com o l-Trp pelo mesmo sistema transportador para dentro do cérebro.

SERENI e colaboradores (1966), provocando desnutrição ao aumentar o tamanho da ninhada por rata lactante, encontraram diminuição do conteúdo cerebral de 5-HT em ratos desnutridos de até 6-8 dias. No entanto, não verificaram qualquer diferença no conteúdo cerebral desse neurotransmissor entre os grupos controle e desnutrido, aos 14 dias de vida. Também utilizando o mesmo método para desnutrir, ISHIMURA e colaboradores (1989) encontraram degeneração de fibras serotoninérgicas e diminuição do número de corpos celulares imunoreativos à serotonina no sistema da raphe dorsalis, sugerindo uma diminuição do conteúdo de serotonina no tronco encefálico. No entanto, esses mesmos autores aventaram a possibilidade de que a diminuição da imunoreatividade à serotonina tenha sido causada por uma redução da quantidade de proteína ligada a esse neurotransmissor.

FERNSTROM e colaboradores (1985) mostraram que uma dieta cujo teor proteico variou entre 12-40% de caseína, não foi capaz de elevar o conteúdo cerebral de l-Trp, 5-HT e 5-HIAA, embora tenha causado aumento dos níveis plasmáticos de l-Trp, e explicaram que o aumento concomitante de LNAA no plasma desses ratos seria responsável por manter inalterada a relação l-Trp/LNAA e equilibrar a competição pelo mesmo carreador a nível da barreira hemato-encefálica.

Afora todas essas observações do envolvimento do sistema serotoninérgico na desnutrição, fundamentadas na maior ou menor disponibilidade do aminoácido precursor da serotonina, o assunto torna-se ainda mais complexo quando se considera que esse neurotransmissor foi necessário para a manutenção do peso corporal normal de ratos, em face de ter ocorrido crescimento dos animais machos e hiperfagia e obesidade em fêmeas quando foi injetada 5,7-dihidroxitriptamina, uma neurotoxina, nos ventrículos laterais e na região do hipotálamo medial do cérebro desses animais, respectivamente (HOEBEL, 1985).

Com relação às catecolaminas, os resultados são contraditórios. SERENI e colaboradores (1966) encontraram diminuição do conteúdo cerebral de norepinefrina (NE) em ratos desnutridos com até 14 dias de vida ao utilizar o método das grandes ninhadas para desnutri-los. Por outro lado, embora tenha sido mantida a desnutrição por restrição da ingestão da dieta após o desmame, medidas feitas aos 35 e 45 dias de vida

nesses ratos, não mostraram diferença no conteúdo cerebral de NE em relação às aquelas obtidas de ratos controles da mesma idade.

Foi observada redução na concentração de dopamina (DA) no cérebro dos ratos desnutridos a partir do nascimento, especialmente no corpo estriado (SHOEMAKER e WURTMAN, 1973, apud WIGGINS et al., 1984). Por outro lado, SOBOTKA e colaboradores (1974) não encontraram nenhuma alteração nos níveis de NE e DA no telencéfalo, tronco encefálico ou cerebelo de ratos com 21 dias de vida, cujas mães receberam dieta com baixo teor proteico.

STERN e colaboradores (1975), tendo causado desnutrição pré e pós-natal ao oferecer uma dieta pobre em proteínas para as ratas prenhas e para seus filhotes após o período de amamentação, encontraram aumento significativo da concentração de NE no cérebro desses filhotes desde o nascimento até a idade adulta, exceto no 5º e 16º dias de vida; tentaram, então, justificar a falta de alteração encontrada nesses 2 dias com a observação de que MILLER (1969) evidenciou 2 picos nos níveis cerebrais de aminoácidos livres, aos 5 dias e em torno do 18º dia de vida desses animais.

Além disso, as catecolaminas NE e DA estão envolvidas no controle da ingestão de alimentos: foi relatada a possível existência de um sistema alfa₂ noradrenérgico para estimular a ingestão, especialmente de carboidratos, no hipotálamo paraventricular; possivelmente, receptores beta-adrenérgicos e dopaminérgicos existentes na periferia do hipotálamo lateral, reduziriam a alimentação, particularmente a ingestão de proteínas (HOEBEL, 1985; JHANWAR-UNIYAL et al., 1987).

Variações no conteúdo de colina, normalmente encontradas na dieta, foram acompanhadas por alterações paralelas da concentração de acetilcolina cerebral, especialmente no núcleo caudado (COHEN e WURTMAN, 1976). Induzindo desnutrição em ratos ao aumentar o tamanho da ninhada por rata lactante, REDDY e SASTRY (1978) encontraram diminuição da concentração de fosfatidilcolina cerebral, fonte de colina para a síntese de acetilcolina (GROWDON, 1979). A desnutrição de ratos durante o período neonatal causou diminuição significativa dos níveis de acetilcolina no cérebro (KULKARNI e GAITONDE, 1982, apud WIGGINS et al., 1984).

1.2 - Sobre receptores colinérgicos muscarínicos

Os receptores colinérgicos muscarínicos têm sido exaustivamente estudados graças ao crescente interesse em se esclarecer suas propriedades neuroquímicas e estruturais, como requisito básico para a compreensão dos efeitos de agonistas e antagonistas muscarínicos sobre o comportamento, e conseqüente descoberta de novas drogas mais específicas e eficazes.

A definição original desses receptores como sendo do tipo muscarínico foi baseada na sensibilidade demonstrada por esses receptores ao alcalóide natural muscarina (DALE, 1914, apud PERALTA et al., 1988). No entanto, somente após a observação de agonistas muscarínicos com eficácias distintas em diferentes tecidos (GOYAL e RATTAN, 1978) e a verificação de diferentes estados de afinidade desses receptores por diferentes agonistas (BIRDSALL et al., 1978), foi sugerido a existência de populações heterogêneas desses receptores. No entanto, uma nova classificação para esses receptores apenas surgiu com a utilização da pirenzepina como radioligante em estudos da ligação droga-receptor, ditos estudos de binding (HAMMER et al., 1980; HAMMER e GIACHETTI, 1982; WATSON et al., 1982, 1983, 1984; LUTHIN e WOLFE, 1984; EVANS et al., 1985; LIN et al., 1986). Segundo esses estudos, os receptores muscarínicos foram classificados em M1 (predominantemente cerebral) e M2 (predominantemente cardíaco) quando apresentaram, respectivamente, alta e baixa afinidade pela pirenzepina. No sistema nervoso central de ratos, o subtipo M1 pareceu predominar no corpo estriado, hipocampo e córtex cerebral e o subtipo M2, embora em pouca quantidade, foi predominante em cerebelo e tronco encefálico (WATSON et al., 1983; LUTHIN e WOLFE, 1984; TAYLOR e BROWN, 1989). Em seres humanos, LIN e colaboradores (1986) demonstraram que os córtices frontal e parietal são especialmente ricos em receptores do tipo M1, enquanto o cerebelo e o hipocampo mostraram-se como regiões relativamente pobres nesses receptores. A pirenzepina, agente antimuscarínico primariamente desenvolvido para o tratamento da úlcera péptica (EBERLEIN et al., 1977, apud LIN et al., 1986) estaria ligada a um subconjunto dos receptores muscarínicos reconhecidos pelos clássicos antagonistas N-metil-escopolamina, [³H]NMS, e benzilato de quinuclidinil, [3H]QNB (HAMMER et al., 1980; LUTHIN e WOLFE, 1984; EVANS et al., 1985; LEE e EL-FAKAHANY, 1985).

EVANS e colaboradores (1985) e LEE e EL-FAKAHANY (1985) chegaram, inclusive, a questionar a afirmativa bem aceita de que os antagonistas

muscarínicos clássicos do tipo [³H]NMS e [3H]QNB, ligam-se a uma única população de receptores (HAMMER et al., 1980); no entanto, HUIZEN e colaboradores (1989) justificaram o menor número de receptores ligados à [³H]NMS e ao [3H]QNB, como consequência da natureza hidrofílica do [³H]NMS, ligando-se apenas aos receptores localizados na superfície externa da membrana celular, e da natureza lipofílica do [3H]QNB, que favorece a sua ligação a todos os receptores muscarínicos, quer na superfície da membrana quer no interior de células ainda intactas.

Com a descoberta da droga AF-DX 116, um antagonista muscarínico semelhante à pirenzepina do ponto de vista estrutural, mas com um novo perfil de seletividade, entre os receptores do subtipo M2 de tecidos periféricos de ratos e de outras espécies, foi possível discriminar aqueles de alta afinidade ao AF-DX 116, presentes no coração, e aqueles com baixa afinidade, presentes nas glândulas exócrinas (HAMMER et al., 1986; GIACHETTI et al., 1986; ENGEL et al., 1987; WAELBROECK et al., 1987). Com a forte evidência de heterogeneidade entre os receptores desse subtipo, foi proposto que fossem classificados como M2, para o subtipo cardíaco, e M3, para o subtipo glandular (DOODS et al., 1987; LADINSK et al., 1988).

No homem, com base também em suas características estruturais, os receptores muscarínicos foram classificados em 4 subtipos: HM1, HM2, HM3 e HM4. Dentre todos, o subtipo HM1, cerebral, mostrou a maior afinidade pela pirenzepina e o subtipo HM2, cardíaco, mostrou a maior afinidade pelo AF-DX 116; o receptor HM4, glandular, apresentou maior afinidade pela pirenzepina e AF-DX 116 que o subtipo HM3, cerebral (PERALTA et al., 1988).

Assim como aconteceu para a caracterização do perfil de seletividade dos receptores muscarínicos por certas drogas, avanços na caracterização de sua estrutura somente ocorreram na década de 80, com o progresso da genética molecular para "decodificação" de sua seqüência de aminoácidos.

Através de cromatografia de afinidade, foram purificados os sítios de ligação dos mAChR, confirmando assim sua natureza proteica (PETERSON et al., 1984; HAGA e HAGA, 1985). Com a utilização de técnicas de DNA recombinante, a seqüência de aminoácidos dessas proteínas pode, então, ser determinada (KUBO et al., 1986a; FUKUDA et al., 1987; BONNER et al., 1987). Foi relatada a existência de 4 genes diferentes para codificar os receptores muscarínicos de ratos, designados de m1,

m2, m3 e m4 (BONNER et al., 1987). Nos suínos, foram caracterizados um subtipo de mAChR cerebral (PM1) e outro atrial (PM2) ao desvendarem a codificação genética desses receptores (KUBO et al., 1986b; PERALTA et al., 1988). Com base na análise da seqüência de nucleotídeos condificadores dos mAChR de suínos, foram codificados os receptores HM1 e HM2 do homem, com seqüência praticamente idêntica ao PM1 e PM2, respectivamente, e os receptores HM3 e HM4, que diferem substancialmente daqueles receptores de suínos em algumas seqüências de aminoácidos (PERALTA et al., 1988).

Foi relatado que a estrutura dos 4 subtipos de mAChR encontrados no homem, a exemplo do que também foi referido para outras espécies (KUBO et al., 1986a; FUKUDA et al., 1987), consiste de 7 regiões hidrofóbicas integrantes da membrana plasmática, chamadas de domínios-transmembranas, um terminal amino extracelular e um terminal carboxílico intracelular (BURGEN, 1988; PERALTA et al., 1988). Ainda, foi verificada grande identidade desses domínios e das alças curtas que os interligam entre os 4 subtipos de mAChR do homem, sendo constante a presença de 2 resíduos de ácido aspártico entre o 2º e o 3º domínio-transmembrana, e sugerido que esses resíduos estejam relacionados com o sítio de ligação do receptor muscarínico para a acetilcolina (PERALTA et al., 1988). Um resíduo de ácido aspártico ou ácido glutâmico também foi sugerido como sítio de ligação para a mustarda [3H]propilbenzilcolina e, por analogia, para [3H]NMS (WHEATLEY et al., 1988).

Quanto à natureza estrutural dos sistemas efetores que também regem a diversidade funcional dos vários subtipos de mAChR, relativamente pouco foi estabelecido. Foi sugerido que as diferentes respostas causadas pela interação droga-receptor muscarínico, quer através da inibição da adenilato ciclase (GIL e WOLFE, 1985), quer através do aumento do turnover de fosfatidil-inositol (HARDEN et al., 1986, apud HAGA et al., 1988) ou da regulação de canais iônicos (LOGOTHETIS et al., 1987; CODINA et al., 1987; CHRISTIE e NORTH, 1988), são mediadas pela família das proteínas G associadas à superfície citoplasmática da membrana plasmática, mais especificamente às alças longas 5-6 (NATHANSON, 1987; BURGEN, 1988; WHEATLEY et al., 1988).

1.3 - Sobre acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7)

Desde a sugestão e demonstração de que a acetilcolina (ACh) era hidrolisada por uma enzima (DALE, 1914, e LOEWI e NAVRATIL, 1926, apud MAIN, 1979), foi somente na década de 40 que esta enzima pode ser melhor caracterizada, a partir de estudos da cinética dessa reação enzimática. Foi demonstrado que a reação catalisada pela colinesterase de eritrócito humano era inibida por grandes quantidades de substrato diferentemente do que ocorria com a colinesterase sérica (ALLES e HAWES, 1940, apud MAIN, 1979). Ainda, de maneira oposta ao que foi observada com a colinesterase sérica, a colinesterase presente no tecido nervoso hidrolisava a ACh muito mais rapidamente que a butirilcolina (NACHMANSOHN, 1944, e COHEN et al., 1949, apud MAIN, 1979). Isso levou os autores a designarem de acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), aquela enzima presente em eritrócitos e predominante no tecido nervoso, e de butirilcolinesterase ou pseudocolinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8), aquela encontrada no soro (AUGUSTINSSON e NACHMANSOHN, 1949, e STURGE e WHITTAKER, 1949, apud MAIN, 1979).

No cérebro de ratos, a BuChE representou apenas uma pequena fração da colinesterase total, presente principalmente no citoplasma de astrócitos e outras células gliais, nas paredes dos capilares e no músculo liso dos vasos sanguíneos (KOELLE, 1954). Grande atividade acetilcolinesterásica foi encontrada na fração sinaptossômica subcelular que contém os elementos neuronais pré e pós-sinápticos (ABDEL-LATIF et al., 1970). Alta concentração de AChE foi observada em neurônios do neostriatum, no núcleo lateral do tálamo, no tubérculo olfatório e no núcleo accumbens; muitas outras áreas apresentaram atividade acetilcolinesterásica em menor grau (KOELLE, 1954; JACOBOWITZ e PALKOVITS, 1974; PALKOVITS e JACOBOWITZ, 1974). No neostriatum, técnicas histoquímicas demonstraram uma infraestrutura que pode ser descrita como um mosaico de aglomerados ricos em substância P, descarboxilase do ácido glutâmico, encefalina e receptores opiáceos, que correspondem aos estriossomos pobres em AChE, envolvidos por uma matriz rica em AChE (HEIMER et al., 1986).

Extensa literatura foi publicada sobre as diferentes formas moleculares da AChE que diferem em sua solubilidade e modo de ligação à membrana celular (MASSOULIÉ e BON, 1982). Duas formas moleculares de natureza glicoproteica foram identificadas em homogeneizados de cérebro de rato e de núcleo caudado humano: ES ou SS, forma de fácil solubilização sem o uso de detergente, e HS ou DS, forma cujo

coeficiente de sedimentação na presença de detergente ficou em torno de 10S (RIEGER e VIGNY, 1976; GENNARI e BRODBECK, 1985). Em cérebro de homem adulto, a cromatografia da fração solúvel da enzima apresentou 3 picos com atividade acetilcolinesterásica, sugerindo a presença de 3 isoenzimas (NOGUEIRA et al., 1987).

As formas moleculares da AChE, descritas em vários tecidos e espécies diferentes com diversificado número de isoenzimas, foram resumidamente explicadas por TAYLOR e BROWN (1989) como monômeros, dímeros ou tetrâmeros de subunidades catalíticas agrupadas em duas classes de formas moleculares diferentes: uma classe formada por um conjunto de subunidades catalíticas homólogas, de diferentes graus de hidrofobicidade, ligadas à superfície externa da membrana celular de tecido excitáveis ou não, através de um glicofosfolípídeo; e uma outra classe de AChE formada por subunidades catalíticas diferentes, ligadas por pontes dissulfeto a um filamento de colágeno associado à membrana basal das células. Esta forma assimétrica, segundo esses autores, foram encontradas nas áreas de sinapse, particularmente abundantes na junção neuro-muscular; no cérebro, referiram o achado de uma forma assimétrica semelhante.

Com relação a ontogenia da AChE, IQBAL e TALWAR (1970) mostraram que a atividade acetilcolinesterásica aumentou continuamente com o desenvolvimento do embrião de galinha: no 8º dia de vida embrionária, o cérebro continha apenas 3 isoenzimas e, no 9º dia do embrião, surgiu uma 4ª isoenzima que, a exemplo do que se verificou para as isoenzimas já existentes, manteve-se presente também no 20º dia da embriogênese. Sugeriram, então, que o aumento da atividade acetilcolinesterásica fosse primariamente devido à síntese da enzima.

Caracterizando também as formas da AChE em função de sua ontogenia, RIEGER e VIGNY (1976) mostraram que durante o desenvolvimento do cérebro de rato, houve aumento da proporção entre a forma HS da enzima e a forma ES: na época do nascimento, a forma facilmente solúvel atingiu os mesmos níveis encontrados na idade adulta, mas a forma HS continuou a aumentar, de modo a constituir 90% da atividade total da AChE nos cérebros de ratos adultos.

VIANA (1980) mostrou que a atividade acetilcolinesterásica foi maior nas frações S1 e S2 obtidas de cérebros de ratos adultos que nas mesmas frações obtidas de ratos recém-nascidos. Por sua vez, SERENI e colaboradores (1966) verificaram um aumento gradual da atividade acetilcolinesterásica no cérebro de ratos a partir do 6º dia

de vida pós-natal, atingindo um pico por volta do 35º dia de vida e sofrendo uma ligeira queda no 45º dia. Esta queda, no entanto, não prejudicou o achado de níveis de AChE significativamente maiores na idade adulta que no 6º-8º dia de vida desses animais (SERENI et al., 1966). Uma evolução semelhante para a atividade dessa enzima em função da idade, foi observada no tronco encefálico de ratos (ECKHERT et al., 1976).

Estudo particularizado ao neostriatum de ratos, através de reações histoquímicas específicas para a AChE, mostrou um contínuo aumento da quantidade dessa enzima até aproximadamente o 15º dia após o nascimento (BUTCHER e HODGE, 1976). Segundo esses autores, as reações histoquímicas ocorreram como pontos isolados na porção lateral do caudado-putâmen até a idade de 10 dias e aumentaram na direção medial até que esses núcleos estivessem total e homoganeamente corados. Do ponto de vista funcional, a porção dorso-lateral do caudado-putâmen faz parte do sistema extrapiramidal e a porção ventro-medial é integrante do sistema límbico (ALTAVISTA et al., 1988).

1.4 - Objetivos do trabalho

Os principais objetivos deste trabalho foram estudar alguns componentes do sistema colinérgico (receptor muscarínico e atividade acetilcolinesterásica) em 4 áreas cerebrais (hipocampo, córtex motor, córtex somatosensorial e núcleos da base) de ratos na vigência de desnutrição, através da:

- 1) determinação da densidade e afinidade dos receptores muscarínicos em animais desnutridos e controles, de ambos os sexos, nas idades de 12-19 dias e 5-8 meses;
- 2) determinação da atividade acetilcolinesterásica em cada um dos 8 grupos de animais acima especificados.

Esses componentes do sistema colinérgico estudados, dentro de cada grupo, desnutrido ou controle, foram observados em função da idade.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos, fornecidos pelo biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, onde foram mantidos à temperatura ambiente de cerca de 30°C e submetidos a um ciclo de alternância de claridade e escuridão a cada 12 horas, determinado pela duração do dia e da noite na região.

Os animais divididos em 2 grupos, desnutrido e controle, foram subdivididos de acordo com o sexo e com as seguintes faixas etárias: 12-19 dias e 5-8 meses. O grupo desnutrido foi constituído por filhotes de ratas que receberam dieta para desnutrir desde o acasalamento e durante o período de aleitamento. Após o desmame, aos 21 dias de vida, esses filhotes foram submetidos à mesma dieta materna deficiente. O grupo controle foi mantido com dieta normal para ratos. Todos os animais, desnutridos e controles, receberam água e ração ad libitum.

2.2 - Dietas

A dieta utilizada para desnutrir os animais foi preparada no próprio Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFCE. Todos os ingredientes (tabela 2.2.1) cozinhados e triturados, foram misturados e unidos até formarem uma massa, e levados a cozinhar. Após o cozimento, a farinha de milho foi adicionada à mistura, que foi moldada como pellets com cerca de 2,5cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro, que foram secados na estufa a 60°C por cerca de 12 horas. O controle de qualidade desta ração foi feito a cada 6 meses, através da verificação de sua composição bioquímica centesimal (tabela 2.2.1).

A dieta utilizada para desnutrir é hipoproteica e hipocalórica; as proteínas presentes são de origem vegetal e, portanto, apresentam menor digestibilidade e baixo valor biológico porque são deficientes em um ou mais aminoácidos essenciais e contêm quantidade excessiva de outros aminoácidos (JANSEN, 1972, apud TIRAPEGUI e DE ANGELIS, 1985; FRANCO, 1982). Em termos de teor de colina, por ser principalmente constituída de cereais, essa dieta apresenta os mais baixos níveis desse aminoácido

encontrados nos alimentos: 0,1% versus 1,7% e 0,6% do peso encontrados no ovo e na carne, respectivamente (COHEN e WURTMAN, 1976). A dieta para desnutrir é ainda deficiente em lipídeos, vitaminas e sais minerais.

A tabela 2.2.2 mostra a composição da ração Labina (Purina, Campinas, SP, Brasil) oferecida ao grupo controle.

2.3 - Dissecção de áreas cerebrais (hipocampo, córtex motor, córtex somatosensorial e núcleos da base)

Os animais foram decapitados e apenas os ratos de 5-8 meses de idade receberam, previamente, anestesia superficial com éter etílico. Rapidamente os encéfalos foram retirados e colocados numa lâmina de metal sobre gelo. Seguindo a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi liberada das leptomeninges com a ajuda de uma pinça reta de microdissecção que, progredindo delicada e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex assim divulsionado, foi rebatido para os lados, expondo parte do hipocampo correspondente aos campos CA1-CA3 do corno de Ammon (BAYER, 1986), que foi divulsionado das estruturas vizinhas e retirado (ver figura 2.3.1).

O neostriatum ou caudado-putâmen foi separado das estruturas circunjacentes com a ajuda de uma tesoura de microdissecção, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex. Esses núcleos recebem aferentes dos córtices motor e sensorial e se projetam, em particular, para a substância nigra (HEIMER, 1986). Ver figura 2.3.1.

Após a retirada do neostriatum, procurando-se reconstituir o contorno dos hemisférios cerebrais, o córtex foi recolocado em sua posição inicial e, com uma tesoura de microdissecção, foi retirada sua porção superior e mediana, numa extensão de cerca de 3-5mm, tendo como limite posterior um plano imaginário que dividiria o cérebro em partes iguais, anterior e posterior. Esta parte cortical assim retirada, corresponde à área motora do córtex fronto-parietal (PRAXINOS, 1982), também conhecida como áreas Fr1, Fr2 e Fr3 do córtex frontal, que recebem projeções das áreas somatosensoriais, de núcleos talâmicos e hipotalâmicos, dos núcleos da base, locus coeruleus e núcleos da rafe. Dessa áreas, apenas Fr2 recebe aferentes do córtex

retrosplenial, envolvido no processo de aprendizagem (ZILLES, 1986). Ver figuras 2.3.1 e 2.3.2.

O córtex somatosensorial, denominado área somatosensorial do córtex fronto-parietal (PRAXINOS, 1982) ou áreas FL, HL e Par1-2 do córtex parietal (PRAXINOS, 1986), foi retirado com o auxílio da tesoura de microdissecação, numa extensão de cerca de 3-5mm anteriores ao plano frontal imaginário mencionado anteriormente, imediatamente acima da fissura rinal, na face lateral de cada hemisfério cerebral (figuras 2.3.1 e 2.3.2). Segundo ZILLES (1986), as áreas parietais HL, FL e Par1-2 recebem projeções de mecanorreceptores cutâneos: FL constitui a representação somatosensorial das patas dianteiras do rato, HL representa as patas traseiras, e a parte mais caudal da Par1 corresponde à representação somatosensorial do tronco e da cauda.

Após a dissecação, cada área foi colocada sobre papel de alumínio, pesada e, então, conservada a -10°C por cerca de 24 horas. Quando foi necessário a estocagem por um maior período de tempo (máximo de 1 semana), os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados mais precocemente (BURKE e GREENBAUM, 1987; FIEDLER et al., 1987).

Para cada área cerebral estudada, pools de tecidos dissecados de 3-6 animais foram submetidos ao mesmo procedimento de conservação e reservados para os experimentos de saturação.

2.4 - Determinação da densidade de receptores muscarínicos

2.4.1 - Princípio

A [3H]N-metil-escopolamina liga-se a sítios específicos dentre os 4 primeiros segmentos transmembrana dos receptores muscarínicos (WHEATLEY et al., 1988), existentes nos fragmentos de membrana dos tecidos homogeneizados, ficando retida no filtro de fibra de vidro que permite apenas a filtração de partículas de tamanho inferior a 1µm (VWR SCIENTIFIC, 1985). Portanto, o ligante triciado marca os receptores ligados especificamente (B) presentes no tecido estudado. Por sua vez, a atropina, outro antagonista muscarínico clássico, é utilizada nos "brancos" dos ensaios para que se possa determinar a radioatividade de background ou ligações não específicas.

Acredita-se que a atropina acrescentada ao ensaio numa concentração muitas vezes superior a da [³H]NMS, interaja seletivamente com os mesmos sítios de ligação do receptor, deslocando e deixando livre toda a droga radioativamente marcada (F), que é então filtrada. A radioatividade contida no filtro pode ser contada por cintilação líquida.

2.4.2 - Material

- homogeneizadores (Bellco, EUA);
- micropipetas (H.E. Pedersen, Dinamarca);
- pipetador automático (Gilson, Middleton, WS, EUA);
- banho-maria (FANEM, São Paulo, SP, Brasil);
- discos de filtro de fibra de vidro (GF/B, Whatman, Maidstone, England);
- filtro a vácuo (Millipore, Bedford, MA, EUA);
- estufa de secagem (modelo 315 SE, FANEM, São Paulo, SP, Brasil);
- frascos de vidro para contagem de cintilação (Value Vials, Beckman, Fullerton, CA, EUA);
- contador de cintilação líquida (LS-100, Beckman, Fullerton, CA, EUA);
- balança analítica (modelo H5, Mettler, Suíça).

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

- solução estoque de N-metil-escopolamina: cloreto de [³H]NMS (85Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, EUA) 23,52nM em tampão fosfato de sódio 150mM, pH 7,4;
- solução estoque de atropina: sulfato de atropina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 0,5mM em água bidestilada;
- tampão fosfato de sódio: NaH₂PO₄H₂O (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 150mM em água bidestilada, pH 7,4, ajustado com solução de 1N HCL (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- coquetel de cintilação: 0,5g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 4,0g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, EUA) para 1000ml de tolueno para cintilação (Beckman, Fullerton, CA, EUA).

2.4.3 - Método

Com o tecido cerebral, foram feitos homogeneizados a 10% (peso/volume) em tampão fosfato de sódio. Segundo DOMBROWSKI e colaboradores (1983), alíquotas de 10ul de homogeneizado foram pipetadas em duplicatas e triplicatas, na presença ou não de sulfato de atropina 12,5uM, respectivamente. Todas as amostras foram incubadas com [³H]NMS 1,62nM e tampão fosfato de sódio para o volume final de 200ul, em banho-maria a 37oC, por 30 minutos. Nos experimentos de saturação foram utilizadas 5-6 concentrações crescentes do radioligante: desde 0,06nM até 2,35nM, de modo que pudéssemos obter uma curva de saturação do receptor em função da concentração do ligante.

Os discos de filtro foram lavados 3 vezes com 2ml de solução gelada de cloreto de sódio 0,9% (peso/volume) e levados para secar em estufa a 60°C, por no mínimo 2 horas. Colocados então em frascos contendo 3ml do coquetel de cintilação, foram deixados em repouso por no mínimo 3 horas, e levados para determinar a radioatividade em contador de cintilação líquida, com eficiência média de 25,5%.

2.4.4 - Cálculo da densidade de receptores e da constante de dissociação no equilíbrio

A densidade de receptores muscarínicos (B), em fmol/mg de proteína, para cada concentração do ligante utilizada, foi calculada pela seguinte fórmula:

$$B = \frac{\text{Ligações específicas (cpm)}}{\text{Atividade específica do ligante (cpm/fmol)}} \times 1000$$

Proteína em 10ul de tecido homogeneizado (ug)

Sabendo-se que:

) a média da triplicata das ligações totais (cpm) menos a média da duplicata das ligações inespecíficas (cpm) são as ligações específicas (cpm);

) a atividade específica do ligante (cpm/fmol) é dada pela atividade específica desse ligante, em pCi/fmol, multiplicada por 2,22dpm e pela eficiência de leitura da amostra pelo contador de cintilação líquida (cpm/dpm);

) e que a atividade específica do ligante, em pCi/fmol, é calculada pela seguinte fórmula: $\log A/A_0 = (-t/2,303)$, onde A e A₀ são, respectivamente, a quantidade de radioatividade encontrada no dia do experimento e a radioatividade inicial, λ é a constante de decaimento do trítio e t é o tempo decorrido entre a determinação da radioatividade inicial e o dia do experimento.

Para a obtenção da densidade máxima de receptores (B_{max}) e da constante de dissociação no equilíbrio (K_d) foi utilizado o método de Eadie-Hofstee, método Scatchard reverso (BURT, 1981), que transforma a hipérbole retangular, dada pela curva de saturação dos receptores em função da concentração do ligante, em uma linha reta, onde a interseção com o eixo dos Y fornece o valor de B_{max} e a inclinação dessa reta corresponde ao K_d.

A concentração do ligante livre (F), em nM, correspondente a cada concentração de ligante empregada nos experimentos de saturação e utilizada na construção do gráfico Eadie-Hofstee, foi obtida segundo a fórmula:

F = ligante total (nM) - ligações específicas (nM), onde:

$$\text{ligações específicas (nM)} = \frac{\text{ligante total (nM)} \times \text{lig. específicas (cpm)}}{\text{radioatividade padrão (cpm)}}$$

A radioatividade padrão foi obtida por regra de três simples a partir da média das cintilações por minuto encontrada em uma concentração do ligante total próxima à concentração do ligante empregada no experimento, uma vez que a contagem em cpm cresce linearmente com o aumento da concentração.

A análise de regressão linear utilizada pelo método do Scatchard reverso fornece estimativas razoáveis do B_{max} e K_d, sujeitas apenas a bias que, nos nossos resultados, foi corrigido pelo método do cálculo do SD(Erad) (ZIVIN e WAUD, 1982).

Ver tabela 3.1.3 dos RESULTADOS.

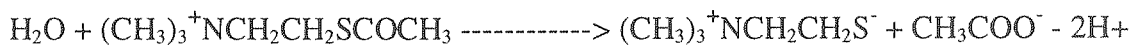
Com o objetivo de encontrar a curva que fosse melhor ajustada aos dados dos experimentos de saturação, foi utilizado um programa simples em BASIC, de regressão não linear, baseado no método dos mínimos quadrados e especialmente desenvolvido para a função da hipérbole retangular (OLIVEIRA FILHO, 1989). Ver figura 7 do APÊNDICE.

2.5 - Determinação da atividade acetilcolinesterásica

2.5.1 - Princípio

A atividade acetilcolinesterásica foi determinada segundo ELLMAN e colaboradores (1961) e consiste na "medida da velocidade de produção de tiocolina quando a acetiltiocolina é hidrolizada. Isto ocorre pela reação contínua do tiol com o íon 5:5'-ditiobis-2-nitrobenzoato (I)

(enzima)



(I)

(II)



para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (II)." 36:89

2.5.2 - Material

Além de ter sido usada a mesma vidraria referida em 2.5.1, foi utilizada a seguinte aparelhagem:

- cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro (Sarstedt, Alemanha Oriental);

- espectrofotômetro (modelo DU, Beckman, Fullerton, CA, EUA) com medidor de absorvância digital e outros acessórios (Modernization System, Gilford, Oberlin, Ohio, EUA).

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

- tampão fosfato de sódio: NaH₂PO₄.H₂O (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1M em água bidestilada, pH 7,0;
- solução de iodeto de acetiltiocolina, ATC (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 75mM em água bidestilada;

2.5.3 - Método

Os tecidos dissecados foram homogeneizados segundo descrição anterior em 2.4.3. Estudos preliminares mostraram que a quantidade de substrato utilizada permitiu que a reação obedecesse a uma cinética de primeira ordem, descartando a possibilidade de que a atividade enzimática encontrada tivesse sofrido qualquer inibição por uma alta concentração do substrato (ALLES e HAWES, 1940, apud MAIN, 1979).

O ensaio enzimático foi feito em duplicata para a amostra testada, segundo o protocolo mostrado na tabela 2.5.3. As leituras das absorvâncias foram feitas no comprimento de onda de 412nm. O "branco" foi utilizado para "zerar" o aparelho antes de cada leitura.

2.5.4 - Cálculo da atividade acetilcolinesterásica

A atividade acetilcolinesterásica (nmol de ATC hidrolizado/mg de proteína/minuto) foi calculada pela seguinte fórmula:

Atividade da AChE (nmol/mg de proteína/min)=A.AChE

$$A.AChE = \frac{\text{absorvância por minuto} / E^{1\mu\text{mol/l}}_{1\text{cm}}}{\text{proteína em 20\mu\text{l de tecido homogeneizado} (\mu\text{g})}} \times 1500$$

Sabendo-se que: absorvância por minuto é a média das absorvâncias por minuto obtidas para as duplicatas do ensaio e que $E^{1\mu\text{mol/l}}$ é o coeficiente de extinção micromolar do

ânion lcm amarelo do ácido 5-tio-2-nitro-benzóico e corresponde a 0,0136 (ELLMAN, 1959).

2.6 - Dosagem de proteína

2.6.1 - Princípio

A cor atribuída inteiramente aos resíduos de triptófano e tirosina, pouco aumentada pelo pré-tratamento com álcali sozinho, aumenta em 3-15 vezes na presença de cobre, quando estes aminoácidos estão ligados a proteínas. A redução do reagente de Folin-Ciocalteu, quando este é acrescentado à proteína tratada com cobre, confere ao ensaio uma cor máxima que é proporcional a concentração de proteína presente (LOWRY et al., 1951).

2.6.2 - Material

A aparelhagem utilizada foi a mesma referida para a determinação enzimática em 2.5.2.

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

- reagente A: Na_2CO_3 (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2% em 0,1N NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- reagente B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5% em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Grupo Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1%;
- reagente C: solução de cobre alcalina (24ml do reagente A com 1ml do reagente B, misturados no momento de usar);
- reagente de Folin-Ciocalteu-fenol (Laborclin, Piraquara, PR, Brasil) 1:1 em água bidestilada;
- solução de albumina sérica bovina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 1mg/ml em água bidestilada.

2.6.3 - Método

Para a determinação da proteína dos homogeneizados do tecido cerebral, foi utilizado o método de LOWRY e colaboradores (1951). Esses homogeneizados foram preparados segundo descrição feita anteriormente em 2.4.3.

A tabela 2.6.3 mostra o protocolo seguido nos experimentos. Os ensaios para a proteína testada, proteína padrão e para o "branco", foram realizados em triplicatas. Após a adição da água bidestilada, do homogeneizado e da albumina bovina, os tubos foram agitados e deixados em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Com a adição do reagente de Folin-Ciocalteu, os tubos foram novamente agitados e mantidos em repouso por 30 minutos sob a mesma temperatura. As leituras das absorvâncias foram feitas no comprimento de onda de 750nm.

2.6.4 - Cálculo da quantidade de proteína

Trabalhando-se dentro do intervalo de linearidade da curva padrão de proteína e sendo a absorvância encontrada para 5 μ l da solução de albumina a correspondente a 5 μ g de proteína, foi calculada a quantidade de proteína da amostra (μ g/5 μ l). Sabendo-se a quantidade de tecido/ μ l de homogeneizado, foi calculada a quantidade de proteína em mg/g de tecido.

2.7 - Pesagem dos animais

Os ratos foram pesados no dia em que foram decapitados, utilizando-se uma balança de precisão (Mettler P3, Micronal, São Paulo, SP, Brasil).

2.8 - Análise estatística

O teste t de Student para dados não pareados foi aplicado para: 1) comparar a média dos resultados obtidos para o grupo desnutrido com àquela obtida para o grupo controle, em cada faixa etária estudada e; 2) comparar a média dos resultados obtidos na idade neonatal com a obtida na idade de 5-8 meses, em cada grupo estudado.

Sendo as amostras provenientes de populações normalmente distribuídas com variâncias populacionais desconhecidas, com o objetivo de aplicar corretamente a estatística do teste t de Student, baseado num nível de significância de 5%, foi utilizado o teste F da razão de variâncias (SANTOS, 1985) para testar as seguintes hipóteses:

$H_0: S_1^2 = S_2^2$ (não existe diferença significativa entre as duas variâncias populacionais) e

$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$ (existe diferença significativa entre as duas variâncias populacionais),

$$S_1^2$$

Onde: $F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$, que tem distribuição F-Snedecor com (n1-1) e (n2-1) graus

$$S_2^2$$

de liberdade.

* H_0 foi rejeitada ao nível = 5%, quando o valor da estatística F foi maior que o percentil $f_{0,975}$ da distribuição amostral de F.

As hipóteses testadas foram:

$H_0: u_1 - u_2 > 0$ (a média populacional u_1 não é inferior à média populacional u_2) e

$H_1: u_1 - u_2 < 0$ (a média populacional u_1 é inferior à média populacional u_2).

H_0 foi rejeitada ao nível = 5%, quando o valor da estatística F foi menor que -K, onde $K = t_{0,95}$.

Quando quisemos testar se uma média populacional foi maior que outra, consideramos as seguintes hipóteses e regra de decisão:

$H_0: u_1 - u_2 < 0$ (a média populacional u_1 não é superior à média populacional u_2) e

$H_1: u_1 - u_2 > 0$ (a média populacional u_1 é superior à média populacional u_2).

H_0 foi rejeitada ao nível = 5%, quando o valor da estatística T foi maior que percentil $t_{(1-\alpha)}$ da distribuição amostral de T.

Todos os cálculos dos testes estatísticos, inclusive a probabilidade de erro ao se aceitar a hipótese H_0 como verdadeira a cada valor da estatística T encontrado,

oram feitos pelo pacote estatístico Minitab Data Analysis Software (versão para computadores IBM-PC, Minitab, 1984)

abela 2.2.1 - Composição centesimal da ração utilizada no grupo experimental

INGREDIENTES	QUANTIDADE (g)	PROTEÍNA	GLICÍDIOS	LIPÍDIOS
Feijão fradinho	20	4,83	10,76	0,30
Arroz polido	20	1,44	15,94	0,12
Milho (farinha)	20	1,92	14,34	0,63
Batata doce (roxa)	20	0,56	4,34	0,02
Abóbora	15	0,18	1,47	0,04
Óleo de soja	04	-	-	4,00
Sal	01	-	-	-
TOTAL	100	8,73	46,85	5,11
CALORIAS	268,31	34,92	187,40	45,99
ADEQUAÇÃO	%	13	70	17

segundo determinação feita por Nádía Maria Macedo Agra (Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Ceará) e Zuleica Braga de Lima Guedes (Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará).

Tabela 2.2.2 - Composição da ração Labina 5001*

Constituintes: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, sal e Premix (misturas minerais e vitamínicas)	
Composição	%
Umidade máxima	13,0
Proteína mínima	23,0
Extrato etéreo mínimo	2,5
Matéria fibrosa máxima	9,0
Matéria mineral máxima	8,0
Cálcio máximo	1,8
Fósforo mínimo	0,8
Enriquecimento (/kg do produto)	
Vitamina A	20.000,0UI
Vitamina D ₃	6.600,0UI
Vitamina E	30.000,0UI
Vitamina K	6,0mg
Vitamina B ₁₂	8,0mg
Pantotenato de cálcio	24,0mg
Niacina	95,0mg
Tiamina	4,0mg
Colina	2,0mg
Piridoxina	6,0mg
Biotina	0,1mg
Ácido fólico	0,5mg
Manganês	50,0mg
Iodo	2,0mg
Ferro	65,0mg
Zinco	35,0mg
Cobre	26,0mg
Antioxidante	100,0mg

* Segundo Purina do Nordeste S.A. (1989)

Tabela 2.5.3 - Procedimento utilizado na determinação da atividade acetilcolinesterásica

SOLUÇÕES	TESTE	“BRANCO”
Água bidestilada	880µl	900µl
Tampão fosfato	500µl	500µl
Tecido homogenizado 10% (p/v)	20µl	-
DTNB	50µl	50µl
ATC	50µl	50µl
TOTAL	1500µl	1500µl

Tabela 2.6.3 - Procedimento utilizado na dosagem de proteínas

SOLUÇÕES	TESTE	PADRÃO	“BRANCO”
Água bidestilada	745µl	700µl	750µl
Homogeneizado do tecido 10% (p/v)	5µl	-	-
Albumina sérica bovina (padrão)	-	50µl	-
Reagente C	500µl	500µl	500µl
Reagente de Folin-Ciocalteu	50µl	50µl	50µl

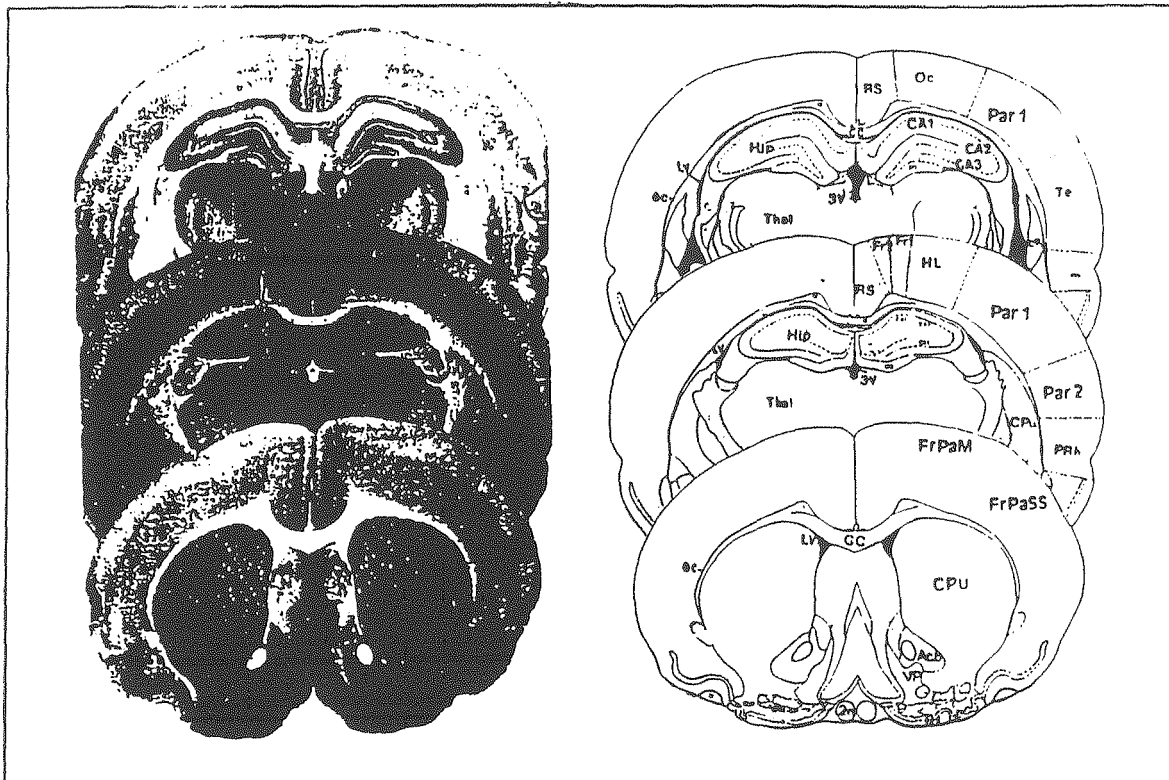


Figura 2.3.1 - Cortes frontais do cérebro de rato: à esquerda, áreas coradas por método histoquímico específico para AChE (KOELLE e FRIEDENWALD, 1949); à direita, desenhos esquemáticos dessas áreas. (Modificado de PRAXINOS, 1986).

Abreviaturas:

2n	nervo óptico
3V	3º ventrículo
Acb	núcleo <u>accumbens</u>
CA1-3	campos CA1 a CA3 do corno de Ammon
cc	corpo caloso
CPu	caudado cutâmen
ec	cápsula externa
Fr1-2	áreas 1 e 2 do córtex frontal
FrPaM	área motora do córtex fronto-parietal
FrPaSS	área somatosensorial do córtex fronto-parietal
Hip	hipocampo
HL	córtex parietal (representação somatosensorial das patas traseiras de rato)
LV	ventrículo lateral
Oc	córtex occipital
Par1-2	área 1 e 2 d córtex parietal
PRh	córtex <u>perirhinal</u>
RS	córtex <u>retrosplenia</u>
Te	córtex temporal
Thal	tálamo

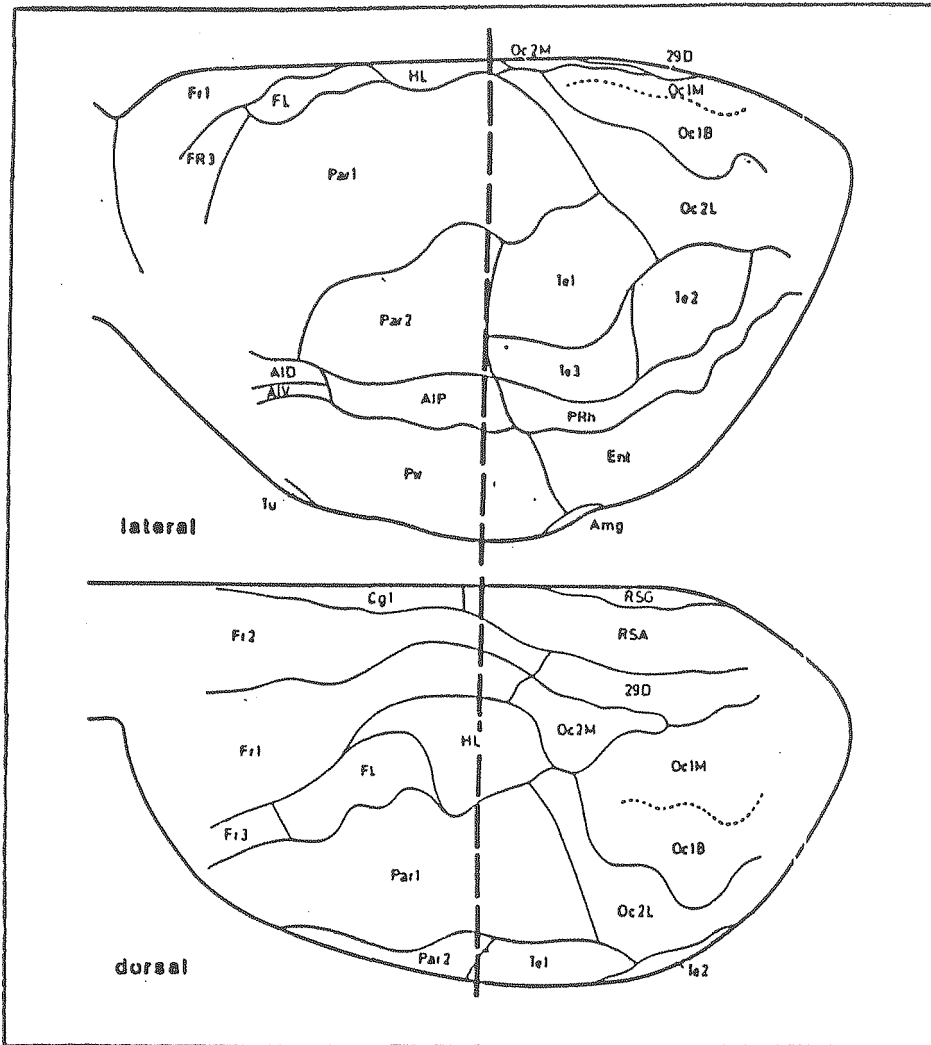


Figura 2.3.2 Vistas lateral e dorsal do cérebro de rato. A linha tracejada representa a posição do plano frontal imaginário que dividiria o cérebro em duas partes, anterior e posterior. Ver explicação no item 2.3 do texto. (Modificado de ZILLES e WREE, 1986).

3 - RESULTADOS

3.1 - Efeitos da desnutrição sobre a densidade de receptores muscarínicos centrais

Em hipocampo, nas duas idades estudadas, não houve diminuição estatisticamente significativa da densidade de mAChR no grupo desnutrido em relação ao grupo controle, tanto entre os animais machos como entre as fêmeas (tabelas 3.1.1 e 3.1.2 e figura 3.1.1). No entanto, a probabilidade de erro muito próxima à do nível de significância estabelecido neste estudo ($p= 0,052$) permite sugerir com maior segurança, que a densidade desses receptores tendeu a diminuir na presença de desnutrição nas fêmeas de 5-8 meses de idade (figura 3.1.2).

Os valores encontrados para as densidades máximas de mAChR (B_{max}) e para as constantes de dissociação no equilíbrio (K_d) em hipocampo, através da análise do Scatchard reverso, nas idades de 12-19 dias e 5-8 meses (figura 3.1.3), são apresentados na tabela 3.1.3. Valores semelhantes foram obtidos por regressão não linear dos resultados provenientes dos experimentos de saturação (tabela 3.1.4).

No que diz respeito à densidade de mAChR em função da idade, em hipocampo, ocorreu aumento significativo da densidade desses receptores nos controles de ambos os sexos com idade de 5-8 meses em relação àqueles em idade neonatal; no grupo desnutrido, foi evidenciada apenas uma tendência para este aumento da densidade com o passar da idade ($p= 0,075$ e $p= 0,135$ para fêmeas e machos, respectivamente). Ver tabelas 3.1.1. e 3.1.2.

Em córtex motor e córtex somatosensorial, também não foi encontrada uma diminuição estatisticamente significativa da densidade de mAChR nos grupos desnutridos, de ratos lactentes e adultos de ambos os sexos, em relação aos respectivos controles (tabelas 3.1.1. e 3.1.2 e figura 3.1.4). Por outro lado, ocorreu aumento da densidade desses receptores em córtex motor de ratos desnutridos de 12-19 dias em relação aos controles da mesma idade (tabela 3.1.2 e figura 3.1.4).

A exemplo do que foi observado em hipocampo, pareceu haver uma tendência para a diminuição da densidade de mAChR nas ratas desnutridas com idade de 5-8 meses, tanto em córtex motor como em córtex somatosensorial ($p= 0,095$ e $p=$

0,090, respectivamente), quando comparadas com os controles da mesma idade (ver figura 3.1.2). As figuras 3.1.5 e 3.1.6 mostram os gráficos de Eadie-Hofstee para córtex motor e córtex somatosensorial, respectivamente, que deram origem aos valores de B_{max} e K_d , nessas áreas, apresentados nas tabelas 3.1.3 e 3.1.4.

A análise da densidade desses receptores nessas duas áreas em função da idade mostrou que, apenas no córtex somatosensorial das ratas controles, foi evidenciada uma tendência para o aumento dessa densidade com o passar dos meses ($p= 0,090$). Ver tabela 3.1.1. Entre os machos, houve aumento significativo da densidade de mAChR nos córtices motor e somatosensorial dos ratos controles com 5-8 meses de idade em relação aos controles em idade neonatal (tabela 3.1.2).

Em núcleos da base de ratas desnutridas, resultados preliminares não mostraram diminuição da densidade de mAChR em relação a seus respectivos controles, nem aumento dessa densidade com o decorrer da idade (tabela 3.1.1 e figura 3.1.1).

A figura 3.1.8 mostra os gráficos da curva de saturação e do Scatchard reverso encontrados para os núcleos da base de ratas desnutridas e controles, nas duas idades estudadas. Os valores de B_{max} e K_d para esta área são apresentados nas tabelas 3.1.3 e 3.1.4.

A análise dos gráficos de Eadie-Hofstee revelou um aumento na afinidade dos mAChR na presença de desnutrição, em todas as áreas e idades estudadas, exceto em núcleos da base, na idade neonatal, onde o K_d não foi diferente do encontrado para os controles da mesma idade (tabelas 3.1.3 e 3.1.4).

3.2 - Efeitos da desnutrição sobre a atividade acetilcolinesterásica em áreas cerebrais

Os ensaios para a determinação da atividade acetilcolinesterásica em hipocampo, córtex motor, córtex somatosensorial e núcleos da base das ratas, não revelaram diminuição significativa deste parâmetro na presença de desnutrição, tanto na idade neonatal como na idade de 5-8 meses, em nenhuma dessas áreas (tabela 3.2.1). Nos animais machos, estes resultados se repetiram em todas as áreas, exceto no córtex motor, onde foi encontrada uma diminuição significativa da atividade

acetilcolinesterásica no grupo desnutrido de 5-8 meses em relação ao controle da mesma idade (tabela 3.2.2).

Analisando os valores encontrados para a atividade acetilcolinesterásica em função da idade, houve aumento estatisticamente significativo dessa atividade enzimática na idade de 5-8 meses em relação à idade neonatal, em hipocampo, tanto no grupo desnutrido como no controle, em ambos os sexos. Este aumento também foi verificado em córtex motor de ratas desnutridas e nos machos do grupo controle. No córtex somatosensorial dos animais machos, diferentemente do que foi encontrado para as fêmeas, ocorreu aumento da atividade acetilcolinesterásica com o decorrer da idade, tanto no grupo experimental como no grupo controle (figura 3.2).

A atividade acetilcolinesterásica em núcleos da base apresentou valores maiores que em qualquer uma das outras áreas estudadas. Resultados preliminares mostraram que não houve diferença significativa da atividade acetilcolinesterásica nessa área entre as ratas desnutridas e controles, nas duas idades estudadas, nem tão pouco ocorreu alteração dessa atividade enzimática com o passar da idade (figura 3.2).

3.3 - Efeitos da desnutrição sobre a quantidade de proteína de áreas cerebrais

Não ocorreu diminuição estatisticamente significativa da quantidade de proteína por grama de tecido cerebral, em nenhuma das áreas estudadas nos animais desnutridos de ambos os sexos, lactentes ou adultos, em relação aos seus respectivos controles (tabelas 3.3.1 e 3.3.2).

Foi observado um aumento significativo do conteúdo proteico com o passar da idade, nos córtices motor e somatosensorial e nos núcleos da base de ratas desnutridas; no grupo controle, este aumento foi verificado apenas no córtex somatosensorial (tabela 3.3.1). Entre os machos, apenas no hipocampo, houve aumento significativo da proteína total nos animais desnutridos de 5-8 meses em relação a aqueles com idade neonatal (tabelas 3.3.1 e 3.3.2).

3.4 - Efeitos da desnutrição sobre o fenótipo e o peso dos animais

As seguintes características foram comuns aos ratos desnutridos: retardo na abertura dos olhos após o nascimento, pêlos ressequidos e eriçados, rarefação e queda dos pêlos, desproporção entre o tamanho da cabeça e o resto do corpo, sangramento conjuntival, diminuição significativa do peso corporal em relação ao peso dos ratos controles da mesma idade, retardo do desenvolvimento motor e menor atividade exploratória do ambiente (figuras 3.4.1 e 3.4.2).

As médias dos pesos corporais de ratos desnutridos com idade de 12-19 dias representaram 39% e 48% (machos e fêmeas, respectivamente) das médias dos pesos encontrados para os respectivos controles da mesma idade; aos 5-8 meses de vida essa deficiência tornou-se ainda maior, sendo as médias dos pesos nos grupos desnutridos de apenas 26% e 32% (machos e fêmeas, respectivamente) daquelas encontradas para os respectivos controles (tabela 3.4).

Em vários filhotes desnutridos foram ainda observadas malformações grosseiras: opacidade da córnea e não abertura total da fenda ocular de um ou de ambos os lados.

O número de filhotes por ninhada desnutrida foi de $6,3 \pm 0,5$ (média \pm EPM de 12 ninhadas observadas). A percentagem de natimortos de ratas desnutridas em relação ao número de filhotes por ninhada foi de 33,3%. Ocorreu canibalismo em 16,7% das ninhadas desnutridas.

Tabela 3.1.1 - Efeito da desnutrição sobre a densidade de mAChR (fmol/mg de proteína) em 4 áreas cerebrais de ratas.

ÁREA CEREBRAL	IDADE	GRUPO	GRUPO
		DESNUTRIDO	CONTROLE
Hipocampo	12-19 dias	336,7 ± 20 (13)	382,9 ± 48 (9)
	5-8 meses	397,8 ± 38 (10)	508,1 ± 51 (10)
		p=0,075	*p=0,048
Córtex motor	12-19 dias	411,6 ± 23 (15)	449,8 ± 37 (15)
	5-8 meses	418,0 ± 38 (8)	483,8 ± 28 (8)
		p=0,440	p=0,27
Córtex somatosensorial	12-19 dias	418,0 ± 29 (16)	409,5 ± 36 (14)
	5-8 meses	411,1 ± 38 (8)	484,5 ± 36 (8)
		p=0,445	p=0,090
Núcleos da base	12-19 dias	747,4 ± 126 (5)	739,7 ± 87 (8)
	5-8 meses	507,8 ± 133 (3)	549,7 ± 81 (4)
		p=0,134	p=0,098

Cada resultado representa a média ± EPM do número de experimentos mostrado entre parênteses. "p" - grupo com idade neonatal x grupo na idade adulta. "*" - aumento significativo (teste t de Student para dados não pareados).

Tabela 3.1.2 - Efeito da desnutrição sobre a densidade de mAChR (fmol/mg de proteína) em 3 áreas cerebrais de ratos.

ÁREA CEREBRAL	IDADE	GRUPO DESNUTRIDO	GRUPO CONTROLE
Hipocampo	12-19 dias	226,3 ± 16 (3)	280,9 ± 10 (5)
	5-8 meses	309,8 ± 25 (5)	343,6 ± 8 (4)
		p=0,135	*p=0,001
Córtex motor	12-19 dias	406,8 ± 14 (2)	289,6 ± 16 (7)
	5-8 meses	379,3 ± 36 (4)	417,0 ± 42 (3)
		p=0,320	*p=0,03
Córtex somatosensorial	12-19 dias	388,7 ± 17 (2)	363,5 ± 19 (7)
	5-8 meses	421,3 ± 43 (4)	443,0 ± 61 (3)
		p=0,320	p=0,065

Cada resultado representa a média ± EPM do número de experimentos mostrado entre parênteses. "p" - grupo com idade neonatal x grupo na idade adulta. "*" - aumento significativo (teste t de Student para dados não pareados).

Tabela 3.1.3 - Efeito da desnutrição sobre a densidade máxima (Bmax) e afinidade (Kd) dos receptores muscarínicos em 4 áreas cerebrais de ratas. Dados obtidos a partir dos gráficos de Eadie-Hofstee.

ÁREA CEREBRAL	IDADE dias (d) meses (m)	GRUPO DESNUTRIDO			GRUPO CONTROLE		
		Bmax	Kd	SD _(Erad)	Bmax	Kd	SD _(Erad)
Hipocampo	12-19 d	353,41	0,64	0,094	632,41	0,80	0,134
	5-8 m	325,27	0,33	0,083	428,55	0,39	0,022
Córtex motor	12-19 d	321,05	0,54	0,072	675,01	0,65	0,089
	5-8 m	266,62	0,28	0,023	471,86	0,43	0,042
Córtex somatosensorial	12-19 d	323,23	0,48	0,129	388,89	0,50	0,056
	5-8 m	361,90	0,32	0,067	505,45	0,53	0,032
Núcleos da base	12-19 d	525,66	0,58	0,091	930,75	0,59	0,131
	5-8 m	448,01	0,37	0,052	674,15	0,49	0,051

O Bmax é dado em fmol/mg de proteína e o Kd, em nM. Ver item 3.1 do texto para explicação.

Tabela 3.1.4 - Efeito da desnutrição sobre o Bmax (fmol/mg de proteína) e o Kd (nM) de 4 áreas cerebrais de ratas. Dados obtidos a partir do programa de regressão não linear da função da hipérbole retangular.

ÁREA CEREBRAL	IDADE dias (d) meses (m)	GRUPO DESNUTRIDO		GRUPO CONTROLE	
		Bmax	Kd	Bmax	Kd
Hipocampo	12-19 d	423,81	1,08	578,30	0,76
	5-8 m	342,35	0,48	460,82	0,60
Córtex motor	12-19 d	377,19	0,88	813,59	1,11
	5-8 m	288,25	0,44	521,80	0,70
Córtex somatosensorial	12-19 d	348,83	0,63	391,57	0,58
	5-8 m	366,11	0,43	550,14	0,81
Núcleos da base	12-19 d	668,04	1,18	959,92	0,81
	5-8 m	512,52	0,70	748,50	0,83

Tabela 3.2.1 - Efeito da desnutrição sobre a atividade acetilcolinesterásica (nmol/mg de proteína/min) em 4 áreas cerebrais de ratas.

ÁREA CEREBRAL	IDADE	GRUPO DESNUTRIDO	GRUPO CONTROLE
Hipocampo	12-19 dias	26,66 ± 1,8 (13)	27,65 ± 2,9 (12) p=0,385
	5-8 meses	45,36 ± 2,3 (9)	44,10 ± 2,1 (9) p=0,210
Córtex motor	12-19 dias	27,69 ± 1,7 (15)	27,32 ± 1,8 (15) p=0,440
	5-8 meses	35,16 ± 3,6 (8)	30,89 ± 3,3 (7) p= 0,200
Córtex somatosensorial	12-19 dias	28,95 ± 1,8 (11)	27,75 ± 2,0 (10) p=0,320
	5-8 meses	29,27 ± 1,7 (8)	26,37 ± 1,4 (8) p=0,105
Núcleos da base	12-19 dias	156,84 ± 21,5 (5)	189,06 ± 18,6 (8) p=0,145
	5-8 meses	128,30 ± 17,1 (3)	159,53 ± 44,1 (4) p=0,230

Cada resultado representa a média ± EPM do número de experimentos mostrado entre parênteses. "p" - grupo desnutrido x grupo controle (teste t de Student para dados não pareados).

Tabela 3.2.2 - Efeito da desnutrição sobre a atividade acetilcolinesterásica (nmol/mg de proteína/min) em 3 áreas cerebrais de ratos.

ÁREA CEREBRAL	IDADE	GRUPO DESNUTRIDO	GRUPO CONTROLE
Hipocampo	12-19 dias	23,1 ± 3,3 (3)	26,0 ± 3,6 (5) p=0,310
	5-8 meses	47,6 ± 3,3 (5)	39,2 ± 1,2 (4) *p=0,035
Córtex motor	12-19 dias	27,9 ± 4,5 (4)	22,7 ± 4,7 (7) *p=0,024
	5-8 meses	26,4 ± 1,2 (4)	32,4 ± 0,6 (4) *p= 0,009
Córtex somatosensorial	12-19 dias	26,6 ± 3,2 (3)	25,4 ± 2,4 (6) p=0,380
	5-8 meses	33,9 ± 1,7 (5)	35,4 ± 2,9 (3) p=0,330

Cada resultado representa a média ± EPM do número de experimentos mostrado entre parênteses. "p" - grupo desnutrido x grupo controle. "*" - resultado significativo (teste t de Student para dados não pareados).

Tabela 3.3.1 - Efeito da desnutrição sobre o conteúdo de proteína (mg/g de tecido) em 4 áreas cerebrais de ratas.

ÁREA CEREBRAL	IDADE	GRUPO DESNUTRIDO	GRUPO CONTROLE
Hipocampo	12-19 dias	76,0 ± 3,9 (13)	79,1 ± 6,0 (12) p=0,375
	5-8 meses	81,8 ± 7,9 (10)	80,2 ± 5,7 (10) p=0,435
		p=0,280	p=0,450
Córtex motor	12-19 dias	74,8 ± 5,8 (15)	68,3 ± 2,9 (15) p=0,330
	5-8 meses	80,1 ± 10,2 (8)	89,0 ± 7,3 (8) p=0,245
		p=0,315	*p=0,003
Córtex somatosensorial	12-19 dias	69,4 ± 5,5 (16)	75,1 ± 3,4 (16) p=0,190
	5-8 meses	90,2 ± 4,9 (8)	85,3 ± 5,1 (8) p=0,250
		*p=0,012	p=0,051
Núcleos da base	12-19 dias	74,5 ± 6,0 (6)	69,2 ± 4,5 (8) p=0,240
	5-8 meses	105,1 ± 15,5(3)	75,3 ± 11,8 (4) p=0,092
		*p=0,029	p=0,284

Cada resultado representa a média ± EPM do número de experimentos mostrado entre parênteses. "p" - embaixo, grupo na idade neonatal x grupo na idade adulta; à direita, grupo desnutrido x grupo controle. "*" - aumento significativo (teste t de Student para dados não pareados).

Tabela 3.3.2 - Efeito da desnutrição sobre o conteúdo de proteína (mg/g de tecido) em 4 áreas cerebrais de ratos.

em 3 áreas cerebrais de ratos.

ÁREA CEREBRAL	IDADE	GRUPO DESNUTRIDO	GRUPO CONTROLE
Hipocampo	12-19 dias	62,2 ± 4,2 (3)	69,1 ± 8,6 (5) p=0,295
	5-8 meses	81,4 ± 5,5 (5)	77,9 ± 8,4 (4) p=0,365
		*p=0,026	p=0,245
Córtex motor	12-19 dias	74,1 ± 1,0 (4)	63,1 ± 21,1 (7) p=0,110
	5-8 meses	65,1 ± 12,0 (4)	56,5 ± 7,2 (4) p=0,285
		p=0,240	p=0,300
Córtex somatosensorial	12-19 dias	74,3 ± 7,4 (3)	77,5 ± 6,7 (7) p=0,395
	5-8 meses	57,7 ± 10,0 (5)	70,6 ± 9,6 (3) p=0,220
		p=0,150	p=0,290

Cada resultado representa a média ± EPM do número de experimentos mostrado entre parênteses. "p" - embaixo, grupo na idade neonatal x grupo na idade adulta; à direita, grupo desnutrido x grupo controle. "*" - aumento significativo (teste t de Student para dados não pareados).

Tabela 3.4- Efeito da desnutrição sobre o peso corporal (g) de ratos.
em 3 áreas cerebrais de ratos.

SEXO	IDADE	GRUPO DESNUTRIDO	GRUPO CONTROLE
FÊMEAS	12-19 dias	9,6 ± 0,4 (20)	19,8 ± 0,8 (19)*
	5-8 meses	56,5 ± 4,7 (14)	176,3 ± 4,0 (13)*
MACHOS	12-19 dias	9,7 ± 0,7 (6)	24,6 ± 1,1 (8)*
	5-8 meses	56,6 ± 5,6 (5)	211,8 ± 25,1 (4)*

Cada resultado representa a média ± EPM do número de experimentos mostrado entre parênteses. "*" - $p < 0,001$ (teste t de Student para dados não pareados).

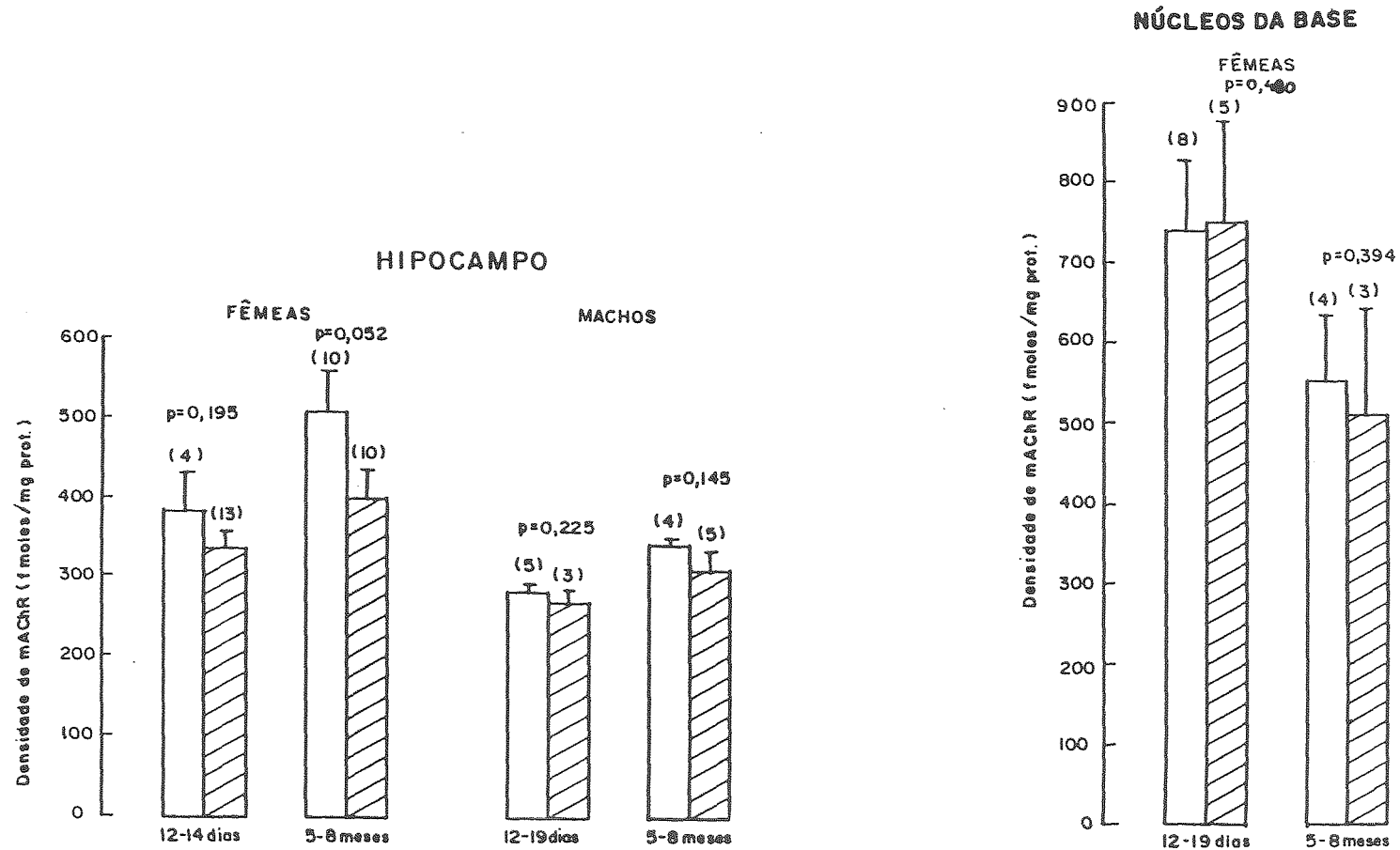


Figura 3.1.1 - Efeito da desnutrição sobre a densidade de receptores muscarínicos em hipocampo e núcleos da base de ratos. Os parênteses encerram o número de animais desnutridos (barras listradas) e controles (barras brancas) utilizados (teste t de Student para dados não pareados).

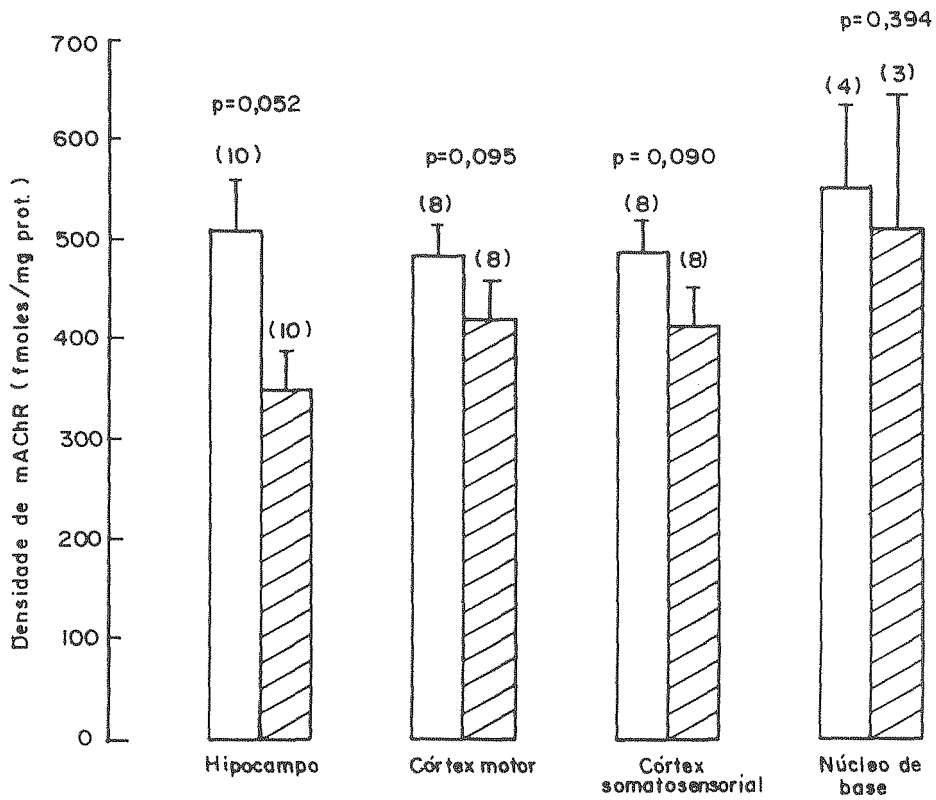


Figura 3.1.2 - Efeito da desnutrição sobre a densidade de receptores muscarínicos em 4 áreas cerebrais de ratas de 5-8 meses de idade. Os parênteses encerram o número de animais desnutridos (barras listradas) e controles (barras brancas) utilizados (teste t de Student para dados não pareados).

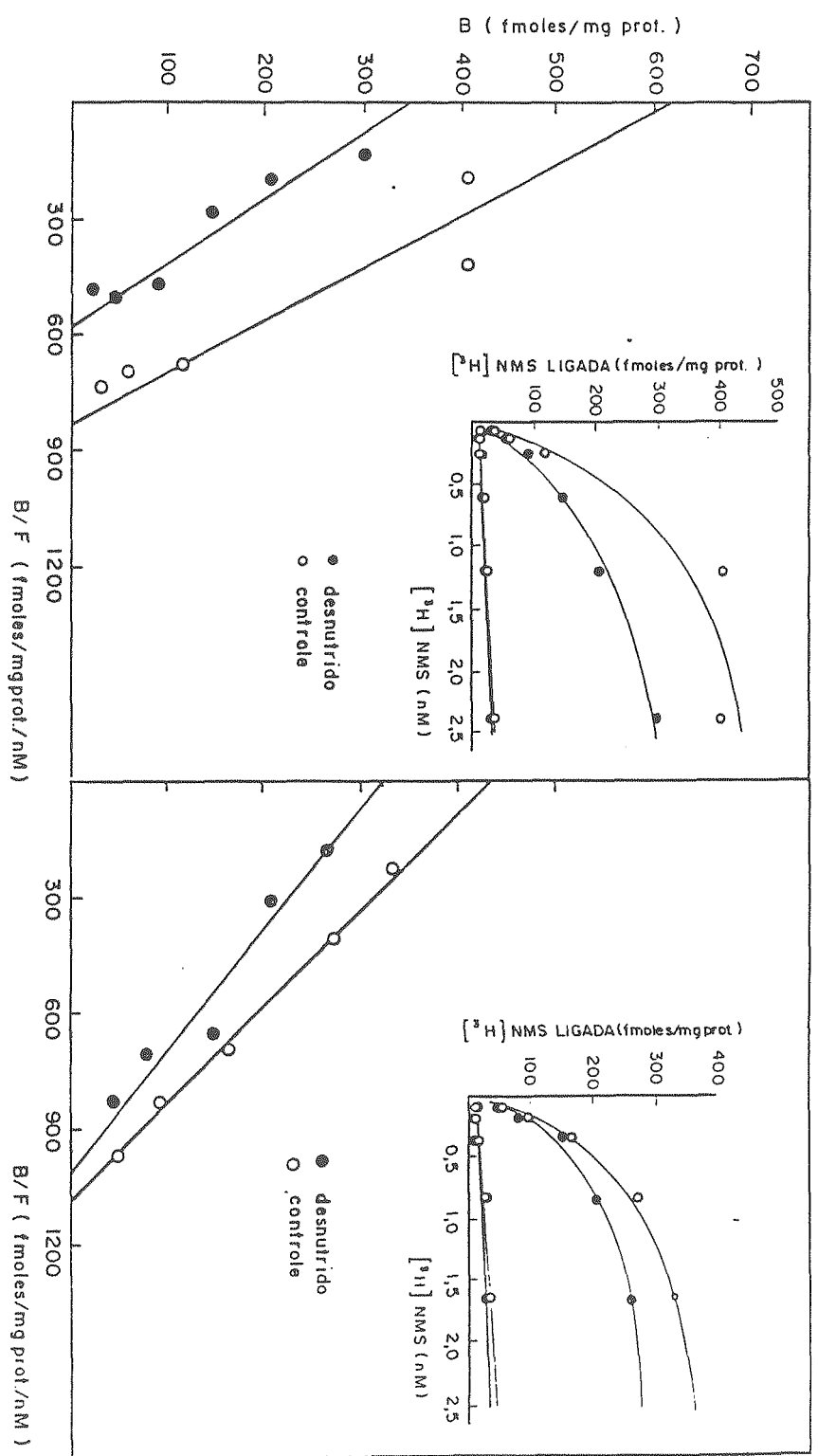
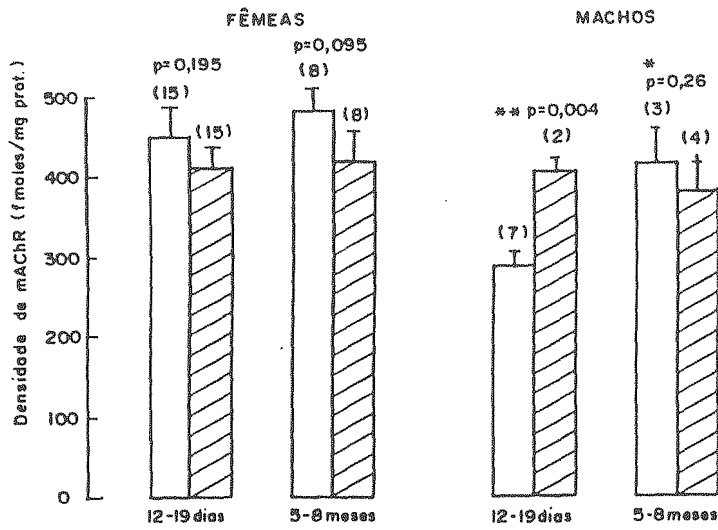


Figura 3.1.3 - Gráfico de Eadie-Hofstee das ligações específicas de $[^3\text{H}]$ NMS em hipocampo de ratas desnutridas e controles, com idades de 12-19 dias (A) e 5-8 meses (B). Imbet: ligações específicas (curvas) e inespecíficas (retas) de $[^3\text{H}]$ NMS, em homogeneizados da área e grupos acima mencionados, em função de concentrações crescentes do ligante total. Os valores de B_{max} e K_d obtidos desses gráficos são mostrados nas tabelas 3.1.3 e 3.1.4

CÓRTEX MOTOR



CÓRTEX SOMATOSENSORIAL

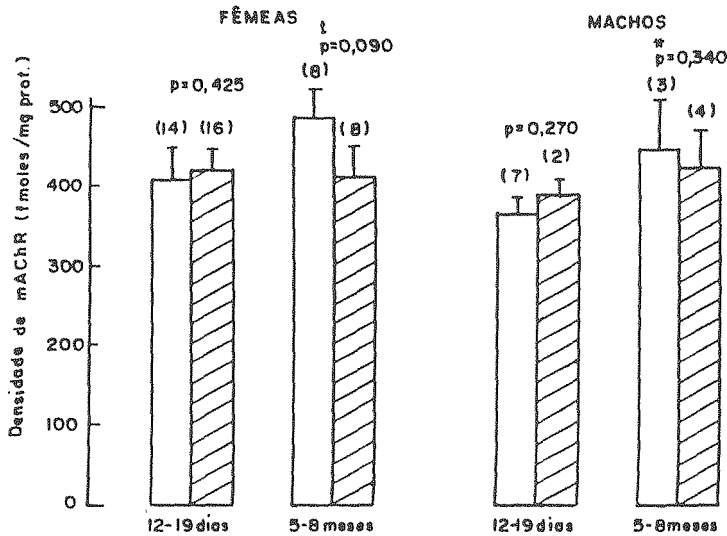


Figura 3.1.4 - Efeito da desnutrição sobre a densidade de receptores muscarínicos nos córtices motor e somatosensorial de ratos. Os parênteses encerram o número de animais desnutridos (barras listradas) e controles (barras brancas) utilizados. "p" - grupo desnutrido x grupo controle ** - aumento significativo (grupo desnutrido x controle). "x" e "t" - aumento significativo e tendência para aumento, respectivamente (grupo controle na idade de 5-8 meses x grupo controle na idade neonatal (teste t de Student para dados não pareados).

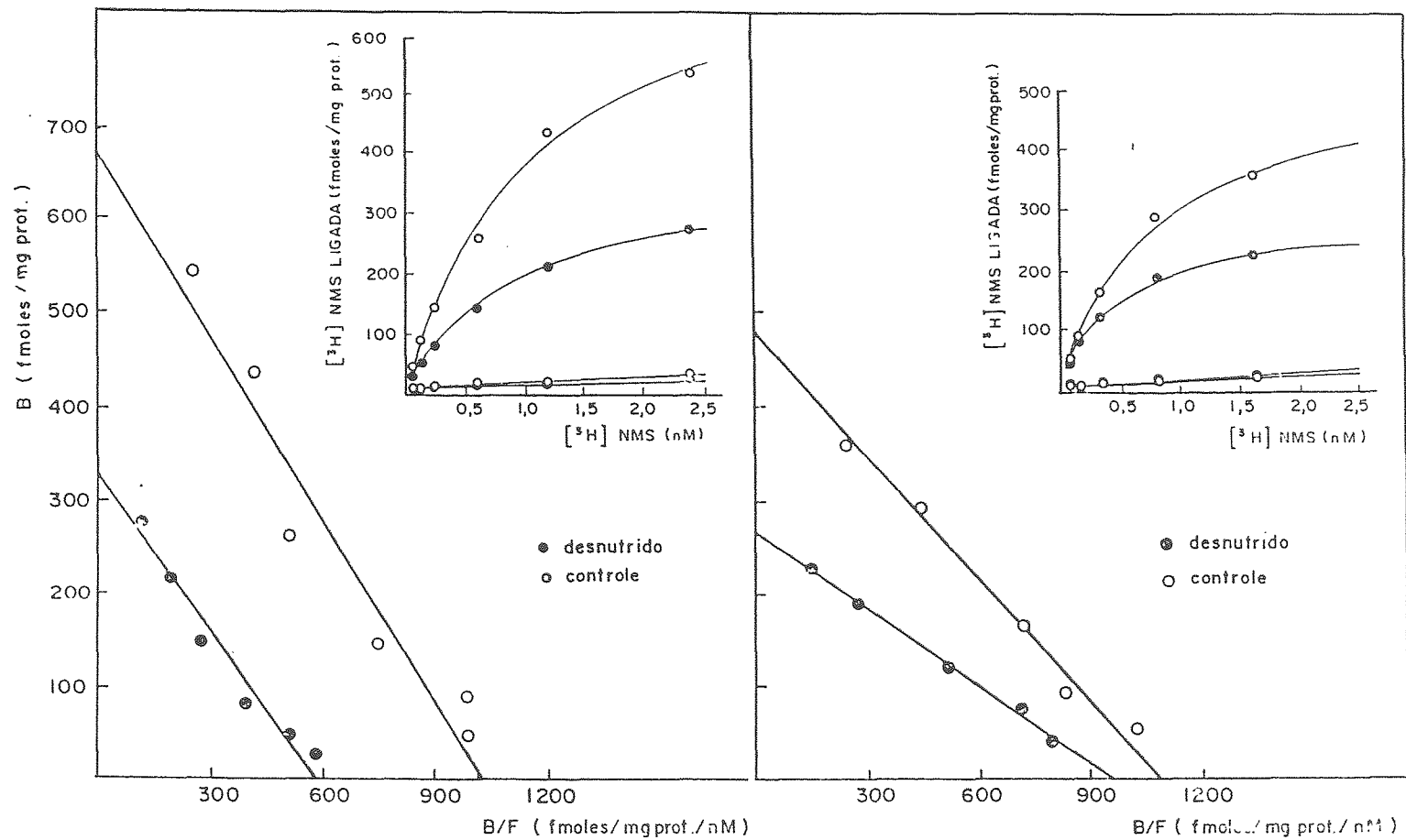


Figura 3.1.5 - Gráfico de Eadie-Hofstee das ligações específicas de $[^3H]$ NMS no córtex motor de ratas desnutridas e controles, com idades de 12-19 dias (A) e 5-8 meses (B). Inset: ligações específicas (curvas) e inespecíficas (retas) de $[^3H]$ NMS, em homogeneizados da área e grupos acima mencionados, em função de concentrações crescentes do ligante total. Os valores de B_{max} e K_d obtidos desses gráficos são mostrados nas tabelas 3.1.3 e 3.1.4.

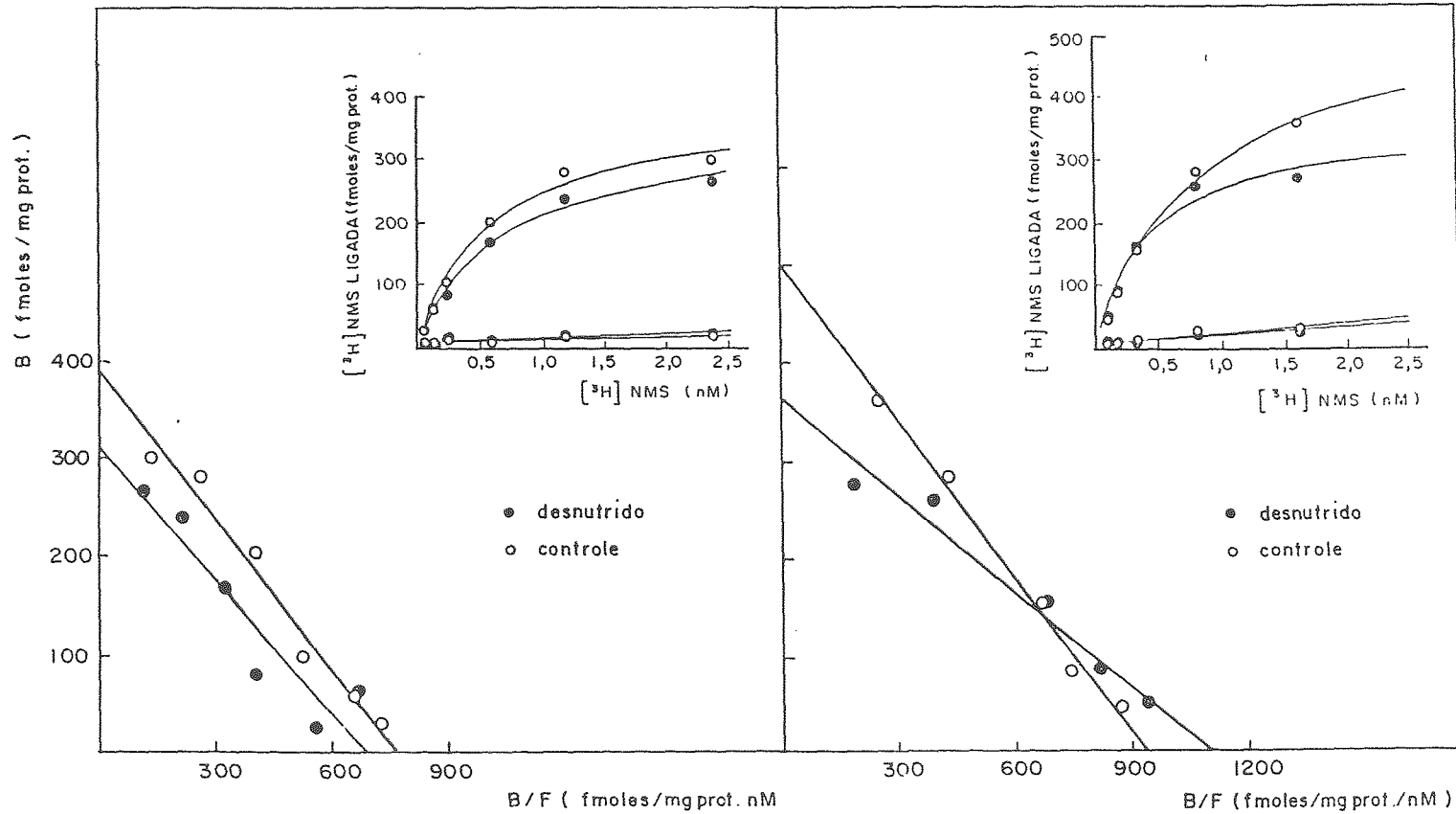


Figura 3.1.6 - Gráfico de Eadie-Hofstee das ligações específicas de $[^3\text{H}] \text{NMS}$ no córtex somatosensorial de ratas desnutridas e controles, com idades de 12-19 dias (A) e 5-8 meses (B). Inset: ligações específicas (curvas) e inespecíficas (retas) de $[^3\text{H}] \text{NMS}$, em homogeneizados da área e grupos acima mencionados, em função de concentrações crescentes do ligante total. Os valores de B_{max} e K_d obtidos desses gráficos são mostrados nas tabelas 3.1.3 e 3.1.4.

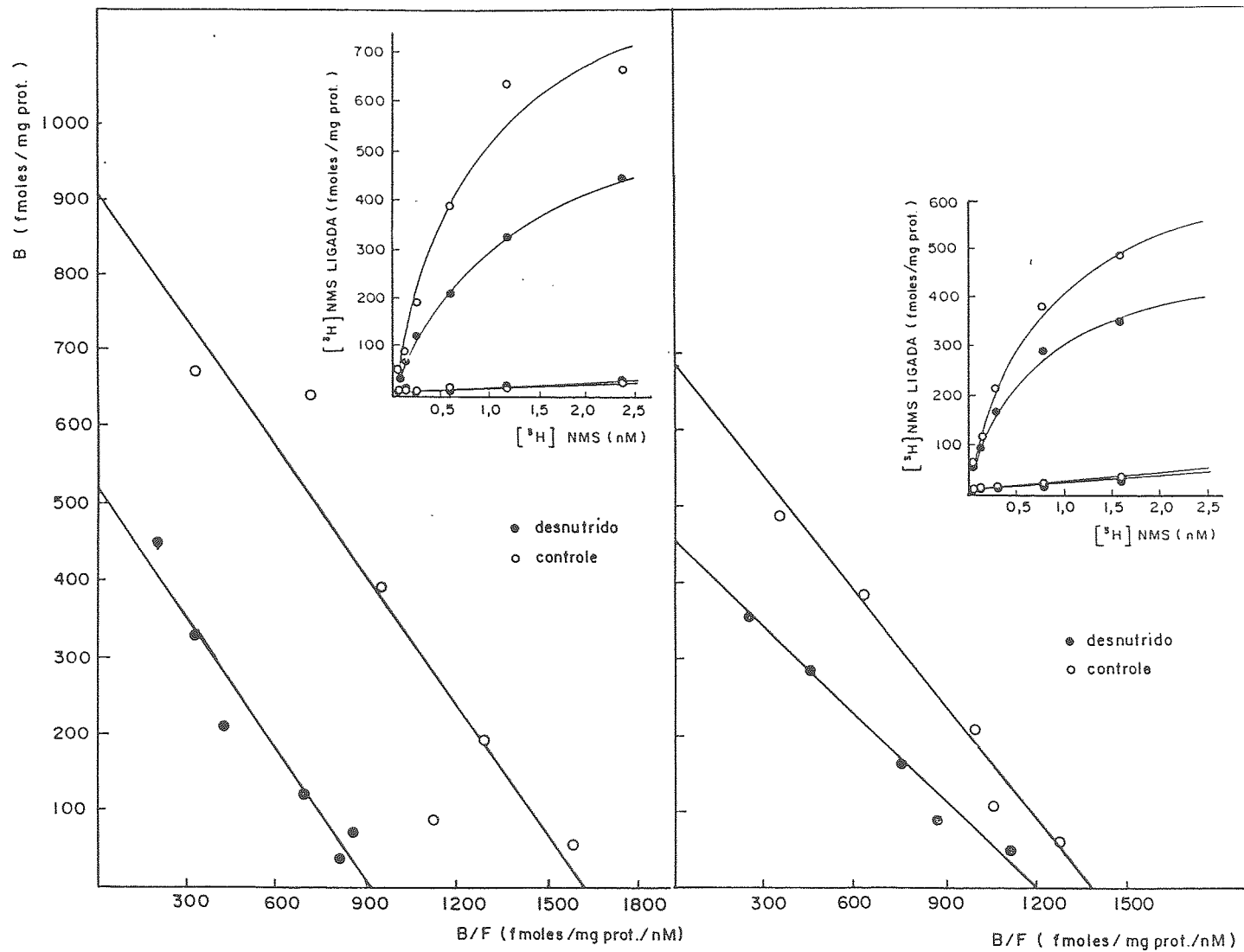


Figura 3.1.7 - Gráfico de Eadie-Hofstee das ligações específicas de [³H]NMS em núcleos da base de ratas desnutridas e controles, com idades de 12-19 dias (A) e 5-8 meses (B). Inset: ligações específicas (curvas) e inespecíficas (retas) de [³H]NMS, em homogeneizados da área e grupos acima mencionados, em função de concentrações crescentes do ligante total. Os valores de B_{max} e K_d obtidos desses gráficos são mostrados nas tabelas 3.1.3 e 3.1.4.

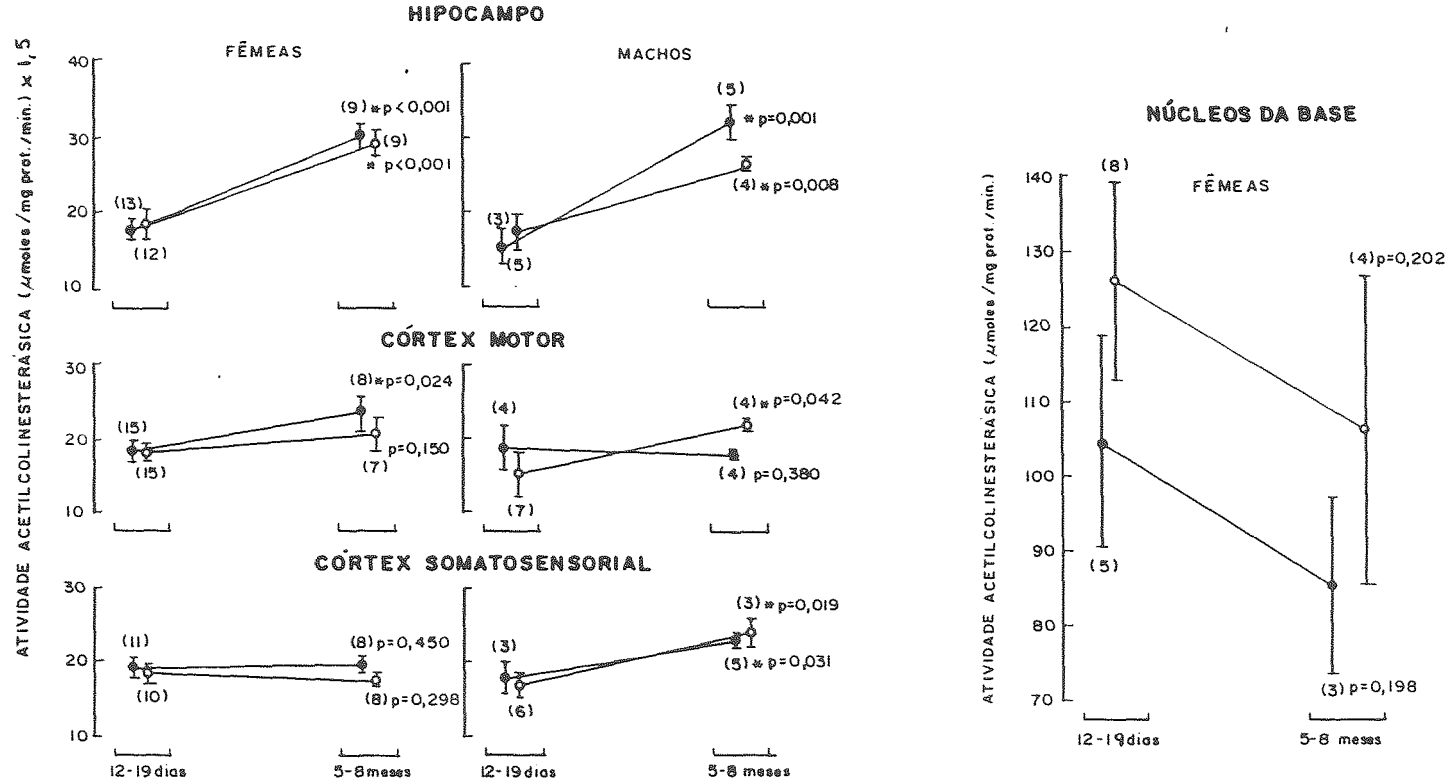


Figura 3.2 - Efeito da desnutrição sobre a atividade acetilcolinesterásica de 4 áreas cerebrais de ratos em função da idade. o-o - grupo desnutrido; o-o - grupo controle. "p" - grupo na idade de 5-8 meses x grupo em idade neonatal. "*" - aumento significativo (teste t de Student para dados não pareados).

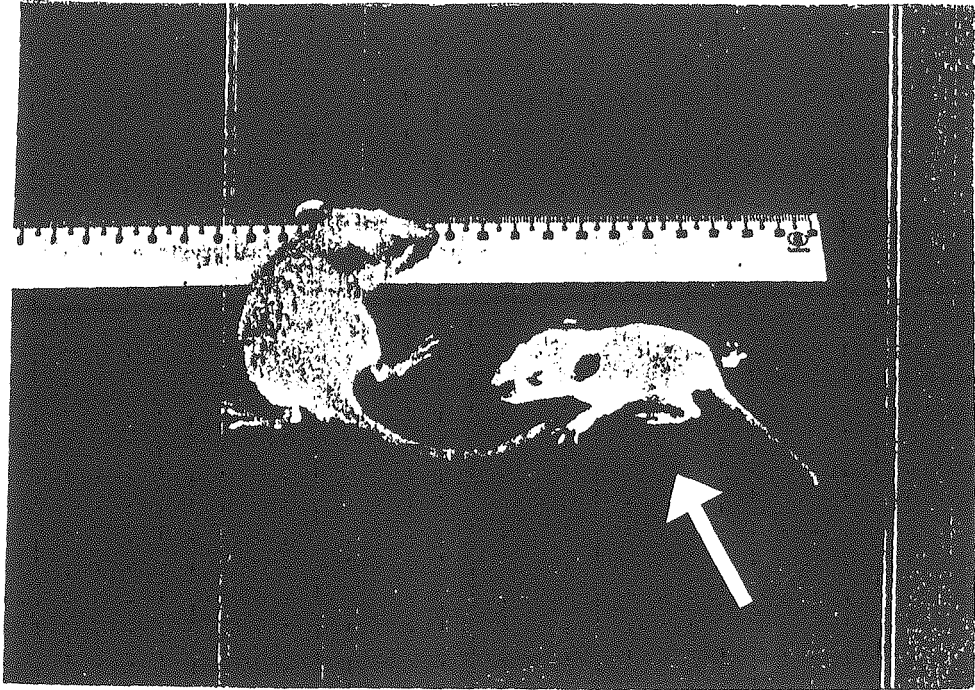


Figura 3.4.1 - Aspectos de ratas, desnutrida (→) e controle, em idade neonatal.

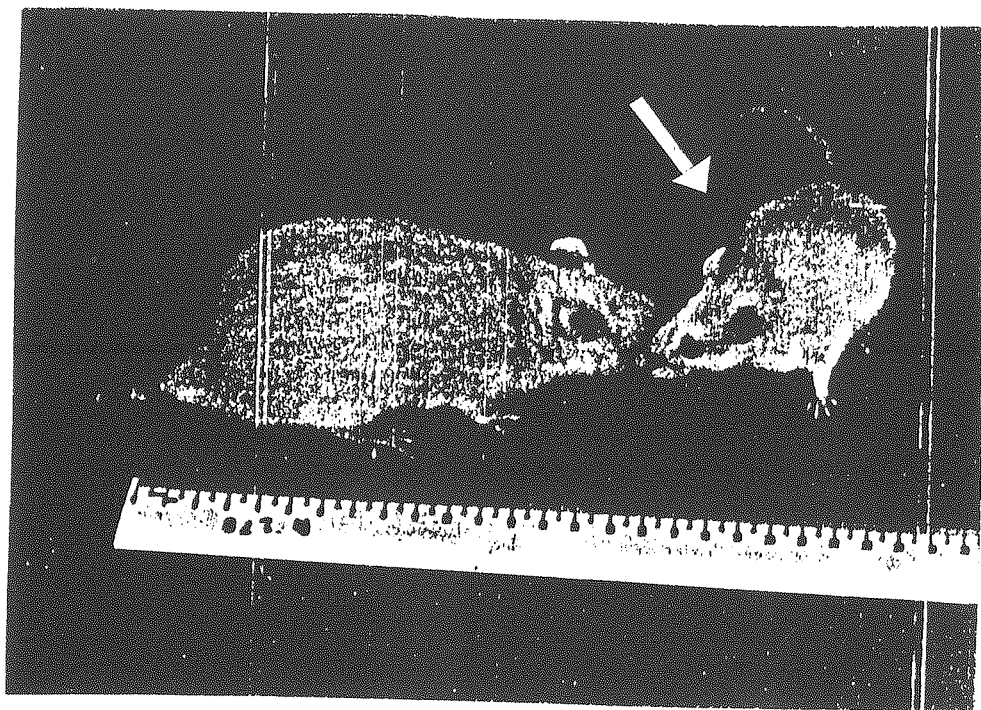


Figura 3.4.2 - Aspectos de ratas, desnutrida (→) e controle, com idade de 5 meses.

DISCUSSÃO

Segundo nossos resultados, a desnutrição proteico-calórica, mesmo quando instalada desde a vida intra-uterina, não foi capaz de causar diminuição significativa da densidade dos mAChR e da atividade acetilcolinesterásica nas quatro áreas cerebrais estudadas, em ratos de ambos os sexos, quer na idade neonatal, quer na idade adulta. Isso nos leva a cogitar que o desenvolvimento do sistema colinérgico, no que tange a esses dois parâmetros estudados, parece ser menos vulnerável à influência prejudicial da desnutrição que outras estruturas cerebrais (ver item 1.1 da INTRODUÇÃO). No entanto, se considerarmos que, de maneira oposta ao que foi observado nos controles, a quase totalidade das áreas estudadas em animais desnutridos, com exceção do hipocampo de ratas, não mostrou aumento significativo da densidade dos mAChR na idade de 5-8 meses em relação à idade neonatal, e que a densidade desses receptores tendeu a diminuir na maioria das áreas cerebrais estudadas em ratas de 5-8 meses de idade quando comparadas às de seus respectivos controles, podemos sugerir então que a desnutrição poderia ter causado um certo retardo do desenvolvimento desses receptores, embora não marcante o suficiente para ser estatisticamente detectado. Esta hipótese pode ser corroborada pelo retardo também observado no processo de maturação neurofibrilar do tecido cerebral na maioria das áreas estudadas nesses ratos desnutridos (VIANA et al., 1988). Os relatos de outros autores que mostraram diminuição da relação sinapse-neurônio no cérebro como um todo e diminuição da quantidade de dendritos apicais no córtex somatosensorial no 30º-50º dia de vida, respectivamente, em ratos desnutridos a partir do nascimento (BASS et al., 1970; THOMAS et al., 1980), quando é conhecido que a diferenciação neuronal e a formação dos elementos sinápticos se completam no 10º-30º dia de vida no desenvolvimento pós-natal normal (BASS et al., 1970), são observações que podem corroborar a suposição de retardo do desenvolvimento dos mAChR na presença de desnutrição.

A hipótese de que tenha ocorrido up-regulation dos mAChR, mascarando ou atenuando os efeitos danosos da desnutrição sobre o sistema colinérgico, pode ser levantada se considerarmos que a desnutrição causou diminuição dos níveis de acetilcolina no cérebro de ratos (RAJALAKSHMI et al., 1974, apud ECKHERT et al.,

1975; KULKARNI e GAITONDE, 1982, apud WIGGINS et al., 1984) e que, a longo prazo, essa diminuição seria capaz de causar aumento da densidade desses receptores colinérgicos, a exemplo do que ocorre na administração crônica de um antagonista muscarínico que possivelmente diminui a normal degradação ou internalização dos receptores induzida pelos níveis fisiológicos do neurotransmissor (YOSHIDA, 1984). No entanto, esta hipótese torna-se sem valor se considerarmos que não encontramos diminuição da atividade acetilcolinesterásica na presença de desnutrição e que, embora a acetilcolinesterase não seja um marcador exclusivo do neurônio colinérgico (KOELLE, 1954), ocorre um paralelismo entre a atividade acetilcolinesterásica e o conteúdo de acetilcolina cerebral (JERUSALINSKY et al., 1981).

A observação de uma maior vascularização das meninges dos animais controles que dos desnutridos, levou-nos a supor que pudesse ter ocorrido uma maior contaminação por sangue dos tecidos cerebrais nos animais controles, elevando a probabilidade de ser dosado um maior conteúdo de proteína nesses tecidos sem o proporcional aumento do número de receptores muscarínicos e diminuindo assim a densidade desses receptores nos controles (dada em femtomoles por mg de proteína). Entretanto, esta hipótese não foi confirmada graças à observação de que o conteúdo proteico em cada uma das áreas estudadas em ratos desnutridos não foi diferente do encontrado para a respectiva área nos animais controles. Por outro lado, a observação de que houve uma tendência para uma maior quantidade de proteína em núcleos da base de ratas desnutridas de 5-8 meses de idade em relação àquela obtida para a mesma área nos respectivos controles, não invalida a nossa suposição a respeito da contaminação pelo sangue das áreas cerebrais nos animais controles nem a negação dessa hipótese, pelo fato da grande variância nos dados referentes ao conteúdo proteico em núcleos da base de ratas desnutridas necessitar ser minimizada por um número maior de experimentos.

Desde que encontramos uma tendência para o aumento da afinidade dos mAChR em praticamente todas as áreas estudadas nas ratas desnutridas em relação a seus respectivos controles, podemos supor que este aumento tenha ocorrido na tentativa de manter o normal funcionamento do sistema colinérgico quando a densidade dos mAChR tendeu a diminuir com a desnutrição. Esta hipótese é corroborada pela observação de que foram encontrados menores valores de K_d nas diversas áreas cerebrais de ratas desnutridas de 5-8 meses em relação às ratas controles da mesma

idade. Por outro lado, nos experimentos de saturação realizados com tecido cerebral de ratas em idade neonatal, utilizamos o ligante numa concentração final superior à utilizada nos experimentos com tecidos de ratas adultas, possibilitando assim o achado de valores maiores para o K_d na idade neonatal. Esse fato, entretanto, não altera a observação de maior afinidade dos receptores na idade adulta porque, mesmo quando retiramos esta última e maior concentração do ligante da análise de regressão linear da curva de saturação dos receptores obtida para cada área cerebral de rata em idade neonatal, o valor encontrado para o K_d ainda foi superior ao obtido para a respectiva área de rata adulta.

Por sua vez, os valores de K_d encontrados nos nossos experimentos para as diversas áreas cerebrais dos animais controles adultos, estão de acordo com os relatados por HAMMER e colaboradores (1980). A diversidade de valores de K_d referidos na literatura para cada área cerebral e para o cérebro como um todo, pode ser explicada pela variedade de preparações ensaiadas e pelas diferentes faixas de concentração e formas isoméricas do ligante utilizadas (BIRDSALL et al., 1978; LEE e EL-FAKAHANY, 1985; NORMAN et al., 1986).

Com relação a isomerização do ligante, gostaríamos de chamar a atenção para o fato de que a atividade específica do ligante, encontrada a cada experimento, foi sempre cerca de 50% daquela estabelecida pelo fabricante, mesmo após termos feito a devida correção do seu valor em função do decaimento da radioatividade com o tempo. Esta observação está de acordo com a discrepância de cerca de 40% encontrada entre os valores da atividade específica da [^3H]NMS determinados por espectrometria de massa e os obtidos dos ensaios de binding (ENSING et al., 1988). Segundo este autor, tal discrepância se deveu à racemização do ligante, reação que deu origem ao seu (+)isômero de menor afinidade (KLOOG e SOKOLOVSKY, 1977). Nos nossos experimentos, entretanto, esta diminuição da atividade específica, encontrada a partir das leituras feitas pelo contador de cintilação, não prejudicou em nada os valores da densidade dos mAChR, uma vez que, ao calcularmos esses valores, consideramos a atividade específica determinada pelo fabricante, após correção do decaimento da radioatividade em função do tempo, corrigida pela eficiência média das leituras da radioatividade do ligante triciado feitas pelo contador de cintilação. Essa eficiência, que

numa amostra padrão de trício foi de cerca de 50%, caiu em média para 25,5% quando utilizamos o radioligante.

WIGGINS e colaboradores (1984) encontraram redução das ligações do [3H]QNB aos mAChR no corpo estriado e hipotálamo de filhotes desnutridos que foram privados da amamentação. No entanto, esses autores não encontraram alterações da densidade dos mAChR no córtex cerebral e cerebelo de ratos na vigência de desnutrição, nem alteração da afinidade dos receptores pelo radioligante em nenhuma das áreas estudadas. A ausência de alterações da afinidade dos receptores, provavelmente aliada à diferente forma de desnutrição causada pela privação dos filhotes à amamentação, são fatores que poderiam justificar os diferentes resultados encontrados por esses autores para a densidade de mAChR em hipocampo na vigência de desnutrição.

Por sua vez, RANSNAS e colaboradores (1989) não encontraram diminuição da densidade nem da afinidade dos mAChR em coração de ratos desnutridos.

Nossos resultados concordaram com os de EL-FAKAHANY e colaboradores (1986) quanto à distribuição regional dos sítios de alta afinidade pelo [3H]NMS: a maior densidade de mAChR foi observada em neostriatum, sendo seguida pelo córtex. No entanto, não observamos diferença de densidade desses receptores entre o hipocampo e as regiões do córtex estudadas, enquanto esses autores mostraram que o hipocampo era mais rico em receptores muscarínicos que o córtex cerebral como um todo.

Com relação à ontogenia dos mAChR, podemos concluir que, em ratos, ainda não ocorreu um completo desenvolvimento desses receptores na idade de 12-19 dias, desde que os resultados obtidos para o grupo controle mostraram que, nos animais machos, a densidade dos mAChR foi maior na idade de 5-8 meses que na idade neonatal, e que houve aumento significativo dessa densidade em hipocampo e uma forte tendência para o aumento em função da idade no córtex somatosensorial de ratas. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por KUHAR e colaboradores (1980) que mostraram aumento da densidade dos mAChR no cérebro de rato como um todo durante o desenvolvimento, atingindo os níveis do adulto em torno do 30º dia de vida. COYLE e YAMAMURA (1976), utilizando [3H]QNB, acharam que 10% da densidade total dos mAChR do adulto estava presente no cérebro do rato ao nascimento e 90% do total, aos 28 dias de vida. Mais especificamente, no córtex cerebral de rato, BALDUINI e

colaboradores (1987) encontraram aumento da densidade até o 75º dia de vida. Entretanto, os maiores valores para essa densidade encontrados por esses autores, podem ser explicados pelo fato de que utilizaram o (-)[³H]QNB como ligante e sabendo-se que apenas 50-65% das ligações específicas desse ligante são ligadas pela (-)[³H]NMS que, por sua vez, é um isômero mais potente que a mistura racêmica de [³H]NMS que utilizamos.

Em se tratando da acetilcolinesterase, considerada um bom marcador dos terminais neuronais por ser encontrada em grande quantidade na fração sinaptosomal que contém os elementos pré e pós-sinápticos (DE ROBERTIS et al., 1962; ABDEL-LATIF et al., 1970), não encontramos diminuição da sua atividade em nenhuma das áreas cerebrais estudadas em fêmeas lactentes ou adultas na presença de desnutrição. Nos machos, entretanto, houve aumento da atividade acetilcolinesterásica em hipocampo e diminuição dessa atividade no córtex motor de animais adultos desnutridos.

ADLARD e DOBBING (1971), causando desnutrição durante o período pré e pós-natal em ratos, conseguiram diminuição da atividade acetilcolinesterásica no cérebro dos animais machos com idade de 21 dias, utilizando uma dieta balanceada para desnutrir. De maneira diferente, nos nossos experimentos, os animais machos lactentes não apresentaram diminuição da atividade acetilcolinesterásica mesmo quando a desnutrição foi causada por uma dieta desbalanceada, sabidamente mais prejudicial para os filhotes no que tange aos parâmetros bioquímicos estudados por TIRAPEGUI e DE ANGELIS (1984).

SOBOTKA e colaboradores (1974), por sua vez, não encontraram qualquer alteração na atividade acetilcolinesterásica em telencéfalo de ratos desnutridos com 21 dias de idade (as fêmeas não participaram desse estudo), corroborando os resultados que obtivemos para os machos desnutridos com idades de 12-19 dias. No entanto, esses autores causaram desnutrição apenas durante o período de aleitamento e decerto não obtiveram um grau de deficiência proteico-calórica suficiente o bastante para influir nos níveis da enzima, uma vez que, afora a ausência de interferência da desnutrição sobre a embriogênese, esses filhotes devem ter recebido maior quantidade de leite do que aqueles desnutridos desde o útero, pois KLIEWER e RASMUSSEN (1987) mostraram que é maior a quantidade de leite produzida por ratas que sofreram restrição

da ingestão de alimentos apenas durante o período de lactação que naquelas cuja restrição alimentar ocorreu desde a prenhez.

Nossos resultados também mostraram um aumento significativo da atividade acetilcolinesterásica em várias áreas cerebrais na idade adulta em relação à idade neonatal, corroborando com a idéia expressa pela literatura de que, via de regra, essa atividade enzimática aumenta com o passar da idade (SERENI et al., 1966; ECKHERT et al., 1976; RIEGER e VIGNY, 1976; VIANA, 1980). Assim, os valores encontrados para a atividade acetilcolinesterásica na idade neonatal que não diferiram estatisticamente daqueles encontrados na vida adulta, em córtex motor de ratos machos e nos córtices motor e somatosensorial das fêmeas, podem sugerir que o desenvolvimento dessas regiões, mormente de seus terminais sinápticos, já poderia estar completo no período neonatal estudado. Por outro lado, os valores semelhantes encontrados para a densidade dos mAChR nessas áreas nas idades de 12-19 dias e 5-8 meses, afastam esta possibilidade.

Na presença de desnutrição, os pesos corporais dos ratos lactentes, de ambos os sexos, foram cerca de 50-60% menores que os pesos dos seus respectivos controles e, com o passar da idade, esses pesos tornaram-se ainda mais deficientes. Isso nos leva a concluir que à medida que continua o estado de deficiência nutricional, progredem os seus efeitos deletérios sobre o organismo, não existindo um mecanismo compensador que atenuie ou acabe com a deficiência de crescimento do organismo de um modo geral. CORDERO e colaboradores (1985), por exemplo, causando desnutrição a partir do nascimento, somente encontraram pesos significativamente menores a partir do 60º dia de vida desses animais e a deficiência de peso foi menor que a observada nos nossos resultados. A literatura concorda com nossos resultados quando refere uma deficiência 44-65% no peso de animais desnutridos com 21 dias de vida e de 84%, aos 3 meses de idade (ADLARD e DOBBING, 1972; SOBOTKA et al., 1974).

Corroborando nossas observações a respeito do fenótipo e comportamento dos animais, outros autores também referiram opacidade da córnea, retardo na abertura dos olhos, habilidade motora prejudicada e menor atividade exploratória (MAHADEVAN et al., 1965, apud GUTHRIE e BROWN, 1968; SMART e DOBBING, 1971, apud SMART et al., 1973; SOBOTKA et al., 1974).

Uma diminuição do número de filhotes por ninhada foi relatada por ALEXANDER e colaboradores (1988), concordando assim com os nossos resultados. Segundo esses autores, ocorre menor número de ovulações nas ratas desnutridas cronicamente.

CONCLUSÕES

1) A desnutrição proteico-calórica, mesmo quando instalada desde a vida intra-uterina, não é capaz de causar diminuição significativa da densidade dos mAChR nem da atividade acetilcolinesterásica em hipocampo, córtex motor, córtex somatosensorial e núcleos da base do cérebro de ratos.

2) Uma forte tendência para a diminuição da densidade dos mAChR nas 4 áreas cerebrais estudadas em fêmeas adultas desnutridas, sugerem que pode ter ocorrido um certo retardo no desenvolvimento desses receptores, embora não tão marcante para ser evidenciado estatisticamente.

3) O aumento da afinidade dos receptores parece ser o mecanismo responsável por atenuar a influência prejudicial da desnutrição sobre os mAChR.

4) Em ratos lactentes desnutridos, o mecanismo que determina o aumento da densidade dos mAChR em córtex motor, carece de ser melhor estudado para poder ser compreendido; também necessitam de esclarecimento as alterações da atividade acetilcolinesterásica que ocorrem em hipocampo e córtex motor de ratos adultos desnutridos

5) A deficiência do peso corporal de ratos varia diretamente com o tempo de instalação da desnutrição.

6) No rato, com base no aumento da densidade e afinidade dos mAChR e da atividade acetilcolinesterásica na maioria das áreas estudadas em função da idade, concluímos que, de um modo geral, o completo desenvolvimento do sistema colinérgico não ocorre antes dos 19 dias de vida .

7) Dentre as 4 regiões cerebrais estudadas, o striatum é a área mais rica em estruturas integrantes do sistema colinérgico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1) ABDEL-LATIF, A.; SMITH, J.; ELLINGTON, E. Subcellular distribution of sodium-potassium adenosine triphosphatase acetylcholine and acetylcholinesterase in developing rat brain. *Brain Res.*, 18: 441-450, 1970.

2) ADLARD, B.P.F. & DOBBING, J. Elevated acetylcholinesterase activity in adult rat brain after undernutrition in early life. *Brain Res.*, 30: 198-199, 1971.

3) ADLARD, B.P.F. & DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. 8. Regional acetylcholinesterase activity in the brains of adult rats undernourished in early life. *Br. J. Nutr.*, 28: 139-143, 1972.

4) ALEXANDER, M.H.; LAZAN, K.S.; RASMUSSEN; K.M. Effect of chronic protein-energy malnutrition on fecundability, fecundity and fertility in rats. *J. Nutr.*, 118: 883-887, 1988.

5) ALLES, G.A. & HAWES, R.C. Cholinesterases in the blood of man. *J. Biol. Chem.*, 133(2): 375-390, 1940, apud MAIN, A.R. Mode of action of anticholinesterases. *Pharmac. Ther.*, 6(3): 579-628, 1979.

- 6) ALTAVISTA, M.C.; BENTIVOGLIO, A.R.; CROCIANI, P.; ROSSI, P.; ALBANESE, A. Age-dependent loss of cholinergic neurons in basal ganglia of rats. *Brain Res.*, 455: 177-181, 1988.
- 7) AUGUSTINSSON, K.B. & NACHMANSOHN, D. Distinction between acetylcholine-esterase and other choline ester-splitting enzymes. *Science*, 110: 98-99, 1949, apud MAIN, A.R. Mode of action of anticholinesterases. *Pharmac. Ther.*, 6(3): 579-628, 1979.
- 8) BALDUINI, W.; MURPHY, S.D.; COSTA, L.G. Developmental changes in muscarinic receptor-stimulated phosphoinositide metabolism in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241(2): 421-427, 1987.
- 9) BASS, N.H.; NETSKY, M.G.; YOUNG, E. Effect of neonatal malnutrition on developing cerebrum. I. Microchemical and histologic study of cellular differentiation in the rat. *Arch. Neurol.*, 23: 289-302, 1970.
- 10) BAYER, S.A. Hippocampal region. In: PRAXINOS, G. *The rat nervous system*. Sydney, Academic Press, 1986. p. 335-352.
- 11) BIRDSALL, N.J.M.; BURGEN, A.S.V.; HULME, E.C. The binding of agonists to brain muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.*, 14: 723-736, 1978.
- 12) BONNER, T.I.; BUCKLEY, N.J.; YOUNG, A.C.; BRANN, M.R. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science*, 237: 527-532, 1987.
- 13) BURGEN, A.S.V. The generation of receptor specificity. *Trends Pharmacol. Sci.*, Suppl. Feb.: 1-5, 1988.
- 14) BURKE, R.E. & GREENBAUM, D. Effect of postmortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. *J. Neurochem.*, 49: 592-596, 1987.

- 15) BURT, D.R. Receptor binding analysis and interpretation. Lecture Notes C: 1-12, 1981.
- 16) BUTCHER, L.L. & HODGE, G.K. Postnatal development of acetylcholinesterase in the caudate-putamen nucleus and substantia nigra of rats. *Brain Res.*, 106: 223-240, 1976.
- 17) CELEDON, J.M.; SANTANDER, M.; COLOMBO, M. Longterm effects of early undernutrition and environmental stimulation on learning performance of adult rats. *J. Nutr.*, 109: 1880-1886, 1979.
- 18) CHASE, H.P.; DORSEY, J.; McKHANN, G.M. The effect of malnutrition on the synthesis of a myelin lipid. *Pediatrics*, 40(4): 551-559, 1967.
- 19) CHRISTIE, M.J. & NORTH, M.J. Control of ion conductances by muscarinic receptors. *Trends Pharmacol. Sci.: Suppl. Feb.*: 30-33, 1988.
- 20) CODINA, J.; YATANI, A.; GRENET, D.; BROWN, A.M.; BIRNBAUMER, L. The α subunit of the GTP binding protein G_{K1} opens atrial potassium channels. *Science*, 236: 442-445, 1987.
- 21) COHEN, E.L. & WURTMAN, R.J. Brain acetylcholine: control by dietary choline. *Science*, 191: 561-562, 1976.
- 22) COHEN, J.A.; KALSBECK, F.; WARRINGA, M.G.P.J. The significance of butyrylcholine in the testing of cholinesterase-containing preparations. *Acta. Brev. Neerl. Physiol.*, 17: 32-39, 1949, apud MAIN, A.R. Mode of action of anticholinesterases. *Pharmac. Ther.*, 6(3): 579-628, 1979.

- 23) CORDERO, M.E.; TREJO, M.; GARCIA, E.; BARROS, T.; COLOMBO, M. Dendritic development in the neocortex of adult rats subjected to postnatal malnutrition. *Early Human Dev.*, 15: 165-177, 1987.
- 24) CORNBLATH, D.R. & BROWN, M.J. Influence of malnutrition on developing rat peripheral nerves. *Exp. Neurol.*, 99: 403-411, 1988.
- 25) COUTINHO, E.M. Desnutrição proteico-calórica. Prova escrita do concurso para livre docente de Patologia da Nutrição do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, 1978.
- 26) COYLE, J.T. & YAMAMURA, H.I. Neurochemical aspects of the ontogenesis of cholinergic neurons in the rat brain. *Brain Res.*, 118: 429-440, 1976.
- 27) DALE, H.H. The action of certain esters and esters of choline and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 6: 147-190, 1914, apud PERALTA, E.G.; WINSLOW, J.W.; ASHKENAZI, A.; SMITH, D.H.; RAMACHANDRAN, J.; CAPON, D.J. Structural basis of muscarinic acetylcholine receptor subtype diversity. *Trends Pharmacol. Sci., Suppl. Feb.*: 7-11, 1988, e apud MAIN, A.R. Mode of action of anticholinesterases. *Pharmac. Ther.*, 6(3): 579-628, 1979.
- 28) DAVIES, C.A. & KATZ, H.B. The comparative effects of early life undernutrition and subsequent differential environments on the dendritic branching of pyramidal cells in rat visual cortex. *J. Comp. Neurol.*, 218: 345-350, 1983.
- 29) DOBBING, J. & SANDS, J. Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Biol. Neonate*, 19: 363-378, 1971.
- 30) DOMBROWSKI, A.M.; JERKINS, A.A.; KAUFFMAN, F.C. Muscarinic receptor binding and oxidative enzyme activities in the adult rat superior cervical ganglion: effects of 6-hydroxydopamine and nerve growth factor. *J. Neurosci.*, 3(10): 1963-1970, 1983.

- 31) DOODS, H.N.; MATHY, M.J.; DAVIDESKO, D.; CHARLDORP, K.J.; JONGE, A.; ZWIETEN, P.A. Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand and in vivo experiments for the putative M1, M2 and M3 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242(1): 257-262, 1987.
- 32) EBERLEIN, V.W.; SCHMIDT, G.; REUTER, A.; KUTTER, E. Anti-ulcer agent pirenzepine (L-S 519) - a tricyclic compound with particular physico-chemical properties. *Arzneim. Forsch. Drug Res.*, 27: 356-359, 1977, apud LIN, S.C.; OLSON, K.C.; OKAZAKI, H.; RICHELSON, E. Studies on muscarinic binding sites in human brain identified with [3H] pirenzepine *J. Neurochem.*, 46: 274-279, 1986.
- 33) ECKHERT, C.; BARNES, R.H.; LEVITSKY, D.A. The effect of protein-energy undernutrition induced during the period of suckling on cholinergic enzyme activity in the rat brain stem. *Brain Res.*, 101: 372-377, 1976.
- 34) EL-FAKAHANY, E.E.; RAMKUMAR, V.; LAI, W.S. Multiple binding affinities of N-methylscopolamine to brain muscarinic acetylcholine receptors: differentiation from M1 and M2 receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 238(2): 554-563, 1986.
- 35) ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77, 1959.
- 36) ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES Jr., V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95, 1961.
- 37) ENGEL, W.; EBERLEIN, W.; TRUMMLITZ, G.; MIHM, G. Pirenzepine and AF-DX 116, two structurally related antimuscarinics with opposite receptor selectivity *Fed. Proc.*, 46: 2527-2529, 1987.

- 38) ENSING, K.; BLOEMHOF, D.A.; HOUT, W.G.; ZEEUW, R.A. Discrepancies in the specific activity of 3H-N-methylscopolamine as determined by mass spectrometry and radioreceptor assay due to racemisation. *Trends Pharmacol. Sci.: Suppl. Feb.*: 77, 1988.
- 39) EVANS, R.A.; WATSON, M.; YAMAMURA, H.I.; ROESKE, W.R. Differential ontogeny of putative M1 and M2 muscarinic receptor binding sites in the murine cerebral cortex and heart. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 235: 612-618, 1985.
- 40) FERNSTROM, J.D.; FERNSTROM, M.H.; GRUBB, P.E.; VOLK, E.A. Absence of chronic effects of dietary protein content on brain tryptophan concentrations in rats. *J. Nutr.*, 115: 1337-1344, 1985.
- 41) FIEDLER, E.P.; MARKS, M.J.; COLLINS, A.C. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. *J. Neurochem.*, 49: 983-990, 1987.
- 42) FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. 7ª ed., Rio de Janeiro, Atheneu, 1986.
- 43) FUKUDA, K.; KUBO, T.; AKIBA, I.; MAEDA, A.; MISHINA, M.; NUMA, S. Molecular distinction between muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Nature*, 327: 623-625, 1987.
- 44) GENNARI, K. & BRODBECK, U. Molecular forms of acetylcholinesterase from human caudate nucleus: comparison of salt-soluble and detergent-soluble tetrameric enzymes species. *J. Neurochem.*, 44: 697-704, 1985.
- 45) GIACHETTI, A.; MICHELETTI, R.; MONTAGNA, E. Cardioselective profile of AF-DX, a muscarine M2 receptor antagonist. *Life Sci.*, 38: 1663-1672, 1986.
- 46) GIL, D.W. & WOLFE, B.B. Pirenzepine distinguishes between muscarinic receptor-mediated phosphoinositide breakdown and inhibition of adenylate cyclase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 232: 608-616, 1985.

- 47) GOYAL, R.K. & RATTAN, S. Neurohumoral, hormonal and drugs receptors for the lower esophageal sphincter. *Gastroenterology*, 74: 598-619, 1978.
- 48) GRIFFIN, W.S.T.; WOODWARD, D.J.; CHANDA, R. Malnutrition and brain development: cerebellar weight, DNA, RNA protein and histological correlations. *J. Neurochem.*, 28: 1269-1279, 1977.
- 49) GROWDON, J.H. Neurotransmitter precursors in the diet: their use in the treatment of brain diseases. In: WURTMAN, R.J. & WURTMAN, J.J. *Nutrition and the brain*. New York, Raven Press, 1979. v. 3. p. 117-181.
- 50) GUEDES, R.C.A. O cérebro desnutrido. *Ciência Hoje*, 3(18): 61-66, 1985.
- 51) HAGA, K. & HAGA, T. Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine brain. *J. Biol. Chem.*, 260: 7927-7935, 1985.
- 52) HAMMER, R.; BERRIE, C.P.; BIRDSALL, N.J.M.; BURGEN, A.S.V.; HULME, E.C. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature*, 283: 90-92, 1980.
- 53) HAMMER, R. & GIACHETTI, A. Muscarinic receptor subtypes: M1 and M2 biochemical and functional characterization. *Life Sci.*, 31: 2991-2998, 1982.
- 54) HAMMER, R.; GIRALDO, E.; SCHIAVI, G.B.; MONFERINI, E.; LADINSKY, H. Binding profile of a novel cardioselective muscarine antagonist, AF-DX 116, to membranes of peripheral tissues and brain in the rat. *Life Sci.*, 38: 1653-1662, 1986.
- 55) HARDEN, T.K.; TANNER, L.I.; MARTIN, M.W.; NAKAHATA, N.; HUGHES, A.R.; HEPLER, J.R.; EVANS, T.; MASTERS, S.B.; BROWN, J.H. TIPS, Suppl. Subtypes of muscarinic receptors II: 14-18, 1986, apud HAGA, T.; HAGA, K.

BERSTEIN, G.; NISHIYAMA, T.; UCHIYAMA, H.; ICHIYAMA, A. Molecular properties of muscarinic receptors. *TIPS*, Suppl. Feb.: 12-18, 1988.

56) HEIMER, L.; ALHEID, G.F.; ZABORSZKY, L. Basal ganglia. In: PRAXINOS, G. *The rat nervous system*. Sydney, Academic Press, 1986. p. 37-86.

57) HERNÁNDEZ, J.R.; MANJARRÉZ, G.G.; CHAGOYA, G. Newborn humans and rats malnourished in utero: free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. *Brain Res.*, 488: 1-13, 1989.

58) HOEBEL, B.G. Brain neurotransmitters in food and drug reward. *Am. J. Clin. Nutr.*, 42: 1133-1150, 1985.

59) HUIZEN, F.; SHAW, C.; WILKINSON, M.; CYNADER, M.S. Characterization of muscarinic acetylcholine receptors in rat cerebral cortex slices with concomitant morphological and physiological assessment of tissue viability. *Mol. Brain Res.*, 5: 59-69, 1989.

60) HYDÉN, H. & LANGE, P.W. Brain proteins in undernourished rats during learning. *Neurobiology*, 5: 84-100, 1975.

61) IQBAL, Z. & TALWAR, G.P. Acetylcholinesterase in developing chick embryo brain. *J. Neurochem.*, 18: 1261-1267, 1971.

62) ISHIMURA, K.; TAKEUCHI, Y.; FUJIWARA, K.; YOSHIOKA, H.; SAWADA, T.; KUSUNOKI, T. Effects of undernutrition on the serotonin neuron system in the developing brain: an immunohistochemical study. *Develop. Brain Res.*, 50: 225-231, 1989.

63) JACOBOWITZ, D.M. & PALKOVITS, M. Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. I. Forebrain (Telencephalon, Diencephalon). *J. Comp. Neur.*, 157: 13-28, 1974.

64) JANSEN, G.R. Seeds as a source of protein for human. In: ENGLETT, G.E. Seed proteins. Westport, AVI Publ., 1972. p. 19, apud TIRAPEGUI, J.O. & DE ANGELIS, R.C. Marginal protein deficiency in pregnant rats. Changes in offspring body composition. *Arq. Gastroenterol.*, 22(2): 83-87, 1985.

65) JERUSALINSKY, D.; AGUILAR, J.S.; BRUSCO, A.; DE ROBERTIS, E. Ontogenesis of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in various areas of chick brain. *J. Neurochem.*, 37(6): 1517-1522, 1987.

66) JHANWAR-UNIYAL, M.; DARWISH, M.; LEVIN, B.E.; LEIBOWITZ, S.F. Alterations in catecholamine levels and turnover in discrete brain areas after food deprivation. *Farmacol. Biochem. Behav.*, 26: 271-275, 1987.

67) JOHNSON, J.D. & DUNHAM, T. Protein turnover in tissues of fetal rat after prolonged maternal malnutrition. *Pediatr. Res.*, 23(5): 534-538, 1988.

68) JORDAN, T.C.; HOWELLS, K.F.; McNAUGHTON, N.; HEATLIE, P.L. Effects of early undernutrition on hippocampal development and function. *Res. Exp. Med.*, 180: 201-207, 1982.

69) KARCZMAR, A.G. Exploitable aspects of central functions, particularly with respect to the EEC, motor, analgesic and mental functions. In: *Advances in behavioral biology*, vol. 24, cholinergic mechanisms and psychopharmacology. pp. 679-708. Editor: D.J. Jendsen. Plenum Press, New York, apud GREMO, F.; PALOMBA, M.; MARCHISIO, A.M.; COSTANTINO, M.; MULAS, M.L.; TORELLI, S. Heterogeneity of muscarinic cholinergic receptors in the developing human fetal brain: regional distribution and characterization. *Early Human Dev.*, 15: 165-177, 1987.

70) KLEIN, R.E.; GILBERT, O.; CANOSA, C.; DE LEON, R. Performance of malnourished in comparison with adequately nourished children on selected cognitive tasks (Guatemala). Paper presented at the Annual Meeting of the American Association

for the Advancement of Science, Boston, Dec., 1969, apud MONCKEBERG, F. The effect of malnutrition on physical growth and brain development. In: PRESCOTT, J.W.; READ, M.S.; COURSIN, D.B. Brain function and malnutrition: neuropsychological methods of assessment. New York, John Wiley & Sons, 1975. p. 15-39.

71) KLIEWER, R.L. & RASMUSSEN, K.M. Malnutrition during the reproductive cycle: effects on galactopoietic hormones and lactational performance in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.*, 46: 926-935, 1987.

72) KLOOG, Y. & SOKOLOVSKI, M. Muscarinic acetylcholine receptors interactions: competition binding studies with agonists and antagonists. *Brain Res.*, 134: 167-172, 1977.

73) KOELLE, G.B. The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neur.*, 100: 211-235, 1954.

74) KUBO, T.; FUKUDA, K.; MIKAMI, A.; MAEDA, A.; TAKAHASHI, H.; MISHINA, M.; HAGA, T.; HAGA, K.; ICHIYAMA, A.; KANGAWA, K.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; NUMA, S. Cloning sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 323: 411-416, 1986a.

75) KUBO, T.; MAEDA, A.; SUGIMOTO, K.; AKIBA, I.; MIKAMI, A.; TAKAHASHI, A.; HAGA, T.; HAGA, K.; ICHIYAMA, A.; KANGAWA, K.; MATSUO, H.; HIROSE, T.; NUMA, S. Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.*, 209: 367-372, 1986b.

76) KUCHAR, M.J.; BIRDSALL, N.J.M.; BURGEM, A.S.V.; HULME, E.C. Ontogeny of muscarinic receptors in rat brain. *Brain Res.*, 184: 375-383, 1980.

- 77) KULKARNI, A.B. & GAITONDE, B.B. *Experientia*, 38: 377-378, 1982, apud WIGGINS, R.C.; FULLER, G.; ENNA, S.J. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. *Life Sci.*, 35: 2085-2094, 1984.
- 78) LADINSKY, H.; GIRALDO, E.; MONFERINI, E.; SCHIAVI, G.B.; VIGANO, M.A.; DE CONTI, L.; MICHELETTI, R.; HAMMER, R. Muscarinic receptor heterogeneity in smooth muscle: binding and functional studies with AF-DX 116. *Trends Pharmacol. Sci., Suppl. Feb.*: 45-48, 1988.
- 79) LEE, J.H. & EL-FAKAHANY, E.E. Heterogeneity of binding of muscarinic receptor antagonists in rat brain homogenates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233: 707-714, 1985.
- 80) LOEWI, O. & NAVRATIL, E. Über humorale übertragbarkeit der herzenwirkung. X. Über das schicksal des vagusstoffes. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, 214: 678-688, 1926, apud MAIN, A.R. Mode of action of anticholinesterases. *Pharmac. Ther.*, 6(3): 579-628, 1979.
- 81) LOGOTHETIS, D.E.; KURACHI, Y.; GALPER, J.; NEER, E.J.; CLAPHAM, D.E. The subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature*, 325: 321-326, 1987.
- 82) LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- 83) LUTHIN, G.R. & WOLFE, B.B. Comparison of [3H] pirenzepine and [3H] quinuclidinyl-benzilate binding to muscarinic cholinergic receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 228: 648-655, 1984.
- 84) MAHADEVAN, S.; MALATHI, P.; GANGULY, S. Influence of proteins on absorption and metabolism of vitamin A. *World Rev. Nutr. Diet.*, 5: 209, 1965, apud

GUTHRIE, H.A. & BROWN, M.L. Effect of severe undernutrition in early life on growth, brain size and composition in adult rats. *J. Nutr.*, 94: 419-426, 1968.

85) MAIN, A.R. Mode of action of anticholinesterases. *Pharmac. Ther.*, 6(3): 579-628, 1979.

86) MASSOULIÉ, J. & BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann. Rev. Neurosci.*, 5: 57-106, 1982.

87) MILLER, S.A. Protein metabolism during growth and development. In: MUNRO, H.N. Mammalian protein metabolism. New York, Academic Press, v. III, 1969, apud STERN, W.C.; MILLER, M.; FORBES, W.B.; MORGANE, P.J.; RESNIK, O. Ontogeny of the levels of biogenic amines in various parts of the brain and in peripheral tissues in normal and protein manourished rats. *Exp. Neurol.*, 49: 314-326, 1975.

88) MONCKEBERG, F. Efecto de la nutricion y medio ambiente sobre el desarrollo psico-motor en el niño. *Cuadernos Medico Sociales*, 9: 5-15, 1969, apud MONCKEBERG, F. The effect of malnutrition on physical growth and brain development. In: PRESCOTT, J.W; READ, M.S.; COURSIN, D.B. Brain function and malnutrition: neuropsychological methods of assessment. New York, John Wiley & Sons, 1975. p. 15-39.

89) MONCKEBERG, F. The effect of malnutrition on physical growth and brain development. In: PRESCOTT, J.W; READ, M.S.; COURSIN, D.B. Brain function and malnutrition: neuropsychological methods of assessment. New York, John Wiley & Sons, 1975. p. 15-39.

90) MORGAN, B.L.G. & NAISMITH, D.J. The effect of early postnatal undernutrition on the growth and development of the rat brain. *Br. J. Nutr.*, 48: 15-23, 1982.

91) NACHMANSOHN, D. On the specificity of choline esterase in nervous tissue. *Science*, 100: 454-469, 1944, apud MAIN, A.R. Mode of action of anticholinesterases. *Pharmac. Ther.*, 6(3): 579-628, 1979.

- 92) NATHANSON, N.M. Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Ann. Rev. Neurosci.*, 10: 195-236, 1987.
- 93) NOGUEIRA, R.M.D.; VIANA, G.S.B.; BRUNO, J.A.; CARVALHO, K.M. Acetylcholinesterase activity in human brains. *Rev. Med. Univ. Fed Ceará*, 24(2): 5-12, 1987.
- 94) NORMAN, A.B.; BLAKER, S.N.; THAL, L.; CREESE, I. Effects of aging and cholinergic deafferentation on putative muscarinic cholinergic receptors subtypes in rat cerebral cortex. *Neurosci. Let.*, 70: 289-294, 1986.
- 95) OLIVEIRA FILHO, R.C. Regressão não-linear da função da hipérbole retangular para aplicação em estudos de binding. Comunicação pessoal, 1989.
- 96) PALKOVITS, M. & JACOBOWITZ, D.M. Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. II. Hindbrain (Mesencephalon, Rhombencephalon). *J. Comp. Neur.*, 157: 29-42, 1974.
- 97) PATEL, A.J. Undernutrition and brain development. *TINS*, April: 151-154, 1983.
- 98) PERALTA, E.G.; WINSLOW, J.W.; ASHKENAZI, A.; SMITH, D.H.; RAMACHANDRAN, J.; CAPON, D.J. Structural basis of muscarinic acetylcholine receptor subtype diversity. *Trends Pharmacol. Sci.*, Suppl. Feb.: 7-11, 1988.
- 99) PETERS, J.C. & HARPER, A.E. Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: effects on food intake, plasma and brain amino acid concentrations and brain neurotransmitter metabolism. *J. Nutr.*, 115: 382-398, 1985.
- 100) PETERSON, G.L.; HERRON, G.S.; YAMAKI, M.; FULLERTON, D.S.; SCHIMERLIK, M.I. Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine atria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 4993-4997, 1984.

101) PRAXINOS, G. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney, Academic Press, 1982.

102) PRAXINOS, G. & WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney, Academic Press. 2nd. ed. 1986.

103) RAJALAKSHMI, R.; KULKARNI, A.B.; RAMAKRISHNAN, C.V. J. Neurochem., 23: 119, 1974, apud ECKHERT, C.D.; LEVITSKY, D.A.; BARNES, R.H. Postnatal stimulation: the effects on cholinergic enzyme activity in undernourished rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 149: 860-863, 1975.

104) RANSNAS, L.; ROTT, C.D.; LUNDHOLM, K.; HJALMARSON, A.; JACOBSSON, B. Effects of malnutrition on rats myocardium -adrenergic and muscarinic receptor. Circ. Res., 64(5): 949-956, 1989.

105) REDDY, P.V. & SASTRY, P.S. Effect of undernutrition on the metabolism of phospholipids and gangliosides in developing rat brain. Br. J. Nutr., 40: 403-411, 1978.

106) RESNIK, O. & MORGANE, P.J. Ontogeny of the levels of serotonin in various parts of the brain in severely protein malnourished rat. Brain Res., 303: 163-170, 1984.

107) RIEGER, F. & VIGNY, M. Solubilization and physicochemical characterization of rat brain acetylcholinesterase: development and maturation of its molecular forms. J. Neurochem., 27: 121-129, 1976.

108) DE ROBERTIS, E.; DE IRALDI, A.; ARNAIZ, G.; SALGNICOFF, L. Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in the rat brain. I. Isolation and subcellular distribution of acetylcholine and acetylcholinesterase. J. Neurochem., 9: 23-25, 1962.

- 109) SALAS, M.; DÍAZ, S.; NIETO, A. Effects of neonatal deprivation on cortical spines and dendritic development of the rat. *Brain Res.*, 73: 139-144, 1974.
- 110) SANTOS, B.J. Estatística aplicada à psicologia. Notas de Curso. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Estatística, Recife, 1985.
- 111) SERENI, F.; PRINCIPI, N.; PERLETTI, L.; SERENI, L.P. Undernutrition and the developing rat brain. *Biol. Neonat.*, 10: 254-265, 1966.
- 112) SHOEMAKER, W.J. & WURTMAN, R.J. *J. Nutr.*, 103: 1537-1547, 1973, apud WIGGINS, R.C.; FULLER, G.; ENNA, S.J. Undernutrition and the brain neurotransmitter systems. *Life Sci.*, 35: 2085-2094, 1984.
- 113) SMART, J.L. & DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of fetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res.*, 33: 303-314, 1971, apud SMART, J.L.; DOBBING, J.; ADLARD, B.P.F.; LYNCH, A.; SANDS, J. Vulnerability of developing brain: relative effects of growth restriction during the fetal and suckling periods on behavior and brain composition of adult rats. *J. Nutr.*, 103: 1327-1338, 1973.
- 114) SOBOTKA, T.J.; COOK, M.P.; BRODIE, R.E. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Res.*, 65: 443-457, 1974.
- 115) STERN, W.C.; MILLER, M.; FORBES, W.B.; MORGANE, P.J.; RESNIK, O. Ontogeny of the levels of biogenic amines in various parts of the brain and in peripheral tissues in normal and protein manourished rats. *Exp. Neurol.*, 49: 314-326, 1975.
- 116) STURGE, L.M. & WHITTAKER, V.P. The esterases of horse blood. I. The specificity of horse plasma cholinesterase and ali-esterase. *Biochem. J.*, 47: 518-530, 1949, apud MAIN, A.R. Mode of action of anticholinesterases. *Pharmac. Ther.*, 6(3): 579-628, 1979.

- 117) TAYLOR, P. & BROWN, J.H. Acetylcholine. In: SIEGEL, G.J. Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. New York, Raven Press, 1989.
- 118) THOMAS, Y.M.; PEELING, A.; BEDI, K.S.; DAVIES, C.A.; DOBBING, J. Deficits in synapse-to-neuron ration due to early undernutrition show evidence of catch-up in later life. *Experientia*, 36: 556-557, 1980.
- 119) TIRAPEGUI, J.O. & DE ANGELIS, R.C. Qualidade da dieta materna e alterações bioquímicas no cérebro dos filhotes. Estudo em ratos. *Arq. Gastroent.*, 21(2): 78-82, 1984.
- 120) VIANA, G.S.B. Atividade acetilcolinesterásica (AChE; EC 3.1.1.7) em cérebro de ratos adultos e recém-nascidos. Tese submetida ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFCE durante concurso para professor titular da disciplina de Farmacologia, 1980.
- 121) VIANA, G.S.; FIGUEIREDO, R.M.O.; BRUNO, J.A. Efeitos da desnutrição sobre a densidade de receptores muscarínicos e a atividade acetilcolinesterásica em cérebro de rato. In: III Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental. Resumos, Caxambu-MG, 1988.
- 122) VWR SCIENTIFIC CATALOG 84/85. San Francisco, VWR Scientific, 1985.
- 123) WAELBROECK, M.; CAMUS, J.; WINAND, J.; CHRISTOPHE, J. Different antagonist binding properties of rat pancreatic and cardiac muscarinic receptors. *Life Sci.*, 41(19): 2235-2240, 1987.
- 124) WATSON, M.; ROESKE, W.R.; JOHNSON, P.C.; YAMAMURA, H.I. [3H] Pirenzepine identifies putative M1 muscarinic receptors in human stellate ganglia. *Brain Res.*, 290: 179-182, 1984.

- 125) WATSON, M.; ROESKE, W.R.; YAMAMURA, H.I. [3H] Pirenzepine selectively identifies a high affinity population of muscarinic cholinergic receptors in the rat cerebral cortex. *Life Sci.*, 31: 2019-2023, 1982.
- 126) WATSON, M.; YAMAMURA, H.I.; ROESKE, W.R. A unique regulatory profile and regional distribution of [3H]-pirenzepine binding in the rat provide evidence for distinct M1 and M2 muscarinic receptor subtypes. *Life Sci.*, 32: 3001-3010, 1983.
- 127) WEST, C.D. & KEMPER, T.L. The effect of a low protein diet on the anatomical development of the rat brain. *Brain Res.*, 107: 221-237, 1976.
- 128) WHEATLEY, M.; HULME, E.C.; BIRDSALL, N.J.M.; CURTIS, C.A.M.; EVELEIGH, P.; PEDDER, E.K.; POYNER, D. Peptide mapping studies on muscarinic receptors: receptor structure and location of the ligand binding site. *Trends Pharmacol. Sci.*, Suppl. Feb.: 19-24, 1988.
- 129) WIGGINS, R.C.; FULLER, G.; ENNA, S.J. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter system. *Life Sci.*, 35: 2085-2094, 1984.
- 130) WINICK, M. & NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J. Nutr.*, 89: 300-306, 1966.
- 131) WINICK, M. & NOBLE, A. Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Develop. Biol.*, 12: 451, 1965, apud WIDDOWSON, E.M. Harmony of growth. *Lancet*, May 2: 901-905, 1970.
- 132) YOSHIDA, H. Introduction: receptors and receptor-mediated responses. Macmillan Press, 1984.
- 133) YUNES, J. Fatores predisponentes. Incidência e prevalência. Mortalidade e morbidade. Prevenção. In: MARCONDES, E. Desnutrição. São Paulo, Sarvier, 1976. p. 29-40.

134) ZAMENHOF, S. & MARTHENS, E. The effects of chronic undernutrition over generations on rat development. *J. Nutr.*, 108: 1719-1723, 1978.

135) ZILLES, K. & WREE, A. Cortex: areal and laminar structure. In: PRAXINOS, G. *The rat nervous system*. Sydney, Academic Press, 1986. p. 375-415.

136) ZIVIN, J.A. & WAUD, D.R. How to analyze binding, enzyme and uptake data: the simplest case, a single phase. *Life Sci.*, 30: 1407-1422, 1982.

134) ZAMENHOF, S. & MARTHENS, E. The effects of chronic undernutrition over generations on rat development. *J. Nutr.*, 108: 1719-1723, 1978.

135) ZILLES, K. & WREE, A. Cortex: areal and laminar structure. In: PRAXINOS, G. *The rat nervous system*. Sydney, Academic Press, 1986. p. 375-415.

136) ZIVIN, J.A. & WAUD, D.R. How to analyze binding, enzyme and uptake data: the simplest case, a single phase. *Life Sci.*, 30: 1407-1422, 1982.

```

1000 REM #####
1010 REM # REGRESSAO NAO LINEAR #
1020 REM # DA FUNCAO #
1030 REM # B = Bmax * ( X / (KD + X) ) #
1040 REM #####
1050 CLS
1060 GOSUB 1730
1070 PRINT : PRINT
1080 INPUT "TECLE A QUANTIDADE DE PONTOS"; NP
1090 DIM YP(NP)
1100 DIM XP(NP)
1110 FOR CP = 1 TO NP
1120 PRINT "TECLE M"; CP: INPUT XP(CP)
1130 PRINT "TECLE B"; CP: INPUT YP(CP)
1140 NEXT CP
1150 CLS
1160 GOSUB 1730
1170 PRINT : PRINT
1180 INPUT "1a. aprox. p/K ="; X0
1190 INPUT "2a. aprox. p/K ="; X1
1200 INPUT "N. max. inter. ="; IM
1210 INPUT "precisao..... ="; EP
1220 INPUT "Imp. pts. int.(S/N)"; BS
1230 KP = X0: GOSUB 1580: F0 = FP
1240 KP = X1: GOSUB 1580: F1 = FP
1250 IF ABS(F0) < EP GOTO 1280
1260 X = X0: FX = F0: XR = ABS(X1 - X0)
1270 GOTO 1310
1280 IF ABS(F1) < EP GOTO 1310
1290 X = X1: FX = F1: XR = ABS(X1 - X0)
1300 REM
1310 IF BS = "N" GOTO 1350
1320 PRINT : PRINT
1330 PRINT "X"; TAB(18); "F(X)"
1340 PRINT
1350 FOR K = 1 TO IM
1360 X = (X0 * F1 - X1 * F0) / (F1 - F0)
1370 KP = X: GOSUB 1580: FX = FP
1380 IF BS = "N" GOTO 1400
1390 PRINT X; FX
1400 XR = ABS(X - X1)
1410 IF ABS(FX) < EP GOTO 1480
1420 IF XR < EP GOTO 1480
1430 X0 = X1: F0 = F1: X1 = X: F1 = FX
1440 NEXT K
1450 PRINT : PRINT : PRINT "* EXCEDIDO N. MAX. DE INTER. *"
1460 PRINT "VALORES OBTIDOS NA ULTIMA INTERACAO"
1470 GOTO 1500
1480 PRINT : PRINT "RESULTADOS FINAIS"
1490 PRINT "-----"
1500 REM
1510 PRINT : PRINT "CTE 'KD' APROX ="; X
1520 KP = X: GOSUB 1580
1530 PRINT : PRINT "CTE Bmax: APROX ="; (M1 + M2) / 2
1540 PRINT : PRINT "ERRO EM 'KD' ="; XR
1550 PRINT : PRINT "TOT. INTERACOES="; K
1560 INPUT "outro calculo (S/N)?"; CS
1570 IF (CS = "n") OR (CS = "N") THEN STOP ELSE RUN
1580 S1 = 0: S2 = 0
1590 FOR CP = 1 TO NP
1600 S1 = S1 + YP(CP) * XP(CP) / (KP + XP(CP))
1610 S2 = S2 + XP(CP) * XP(CP) / (KP + XP(CP)) / (KP + XP(CP))
1620 NEXT CP
1630 M1 = S1 / S2
1640 S3 = 0: S4 = 0
1650 FOR CP = 1 TO NP
1660 S3 = S3 + YP(CP) * XP(CP) / (KP + XP(CP)) / (KP + XP(CP))
1670 S4 = S4 + XP(CP) * XP(CP) / (KP + XP(CP)) / (KP + XP(CP)) / (KP + XP(CP))
1680 NEXT CP
1690 M2 = S3 / S4
1700 FP = M1 - M2
1710 RETURN
1720 STOP
1730 PRINT "#####"
1740 PRINT "# REGRESSAO NAO LINEAR #"
1750 PRINT "# DA FUNCAO #"
1760 PRINT "# B = Bmax * (X/(KD + X)) #"
1770 PRINT "#####"
1780 RETURN

```

Figura 7 - Programa de regressão não linear da função da hipérbole retangular para aplicação em estudos de binding (OLIVEIRA FILHO, 1989).