

Estudo morfoquantitativo do plexo mioentérico do duodeno de ratos submetidos a carência de proteínas e vitaminas do complexo B

Sônia Trannin de Mello^{1*}, Edson Aparecido Liberti², Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana³, Sonia Lucy Molinari¹ e Marcílio Hubner de Miranda Neto¹

¹Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Campus Universitário, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ²Departamento Anatomia Humana, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil. ³Departamento Anatomia Humana da Universidade Paranaense, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência.

RESUMO. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das carências proteica e vitamínica sobre os neurônios do plexo mioentérico do duodeno de ratos. 24 animais, aos 90 dias de idade, foram divididos em dois grupos: controle (n=12) e experimental (n=12). Durante 120 dias, o grupo controle recebeu ração com teor protéico de 22%, vitaminas e minerais; o grupo experimental, 8%, sem suplementação de vitaminas. Após período experimental, coletou-se o sangue dos animais e retirou-se o duodeno para análise ultraestrutural e morfoquantitativa (NADH-d; NADPH-d). O grupo experimental apresentou proteínas totais e albumina plasmática reduzidas e peso inferior aos do grupo controle. A densidade (NADPH-d) foi maior e significante para o grupo experimental; na técnica da NADH-d, o perfil neuronal diferiu entre os grupos. Os aspectos ultraestruturais mostraram-se semelhantes entre os grupos. Os resultados permitem concluir que a dieta imposta promoveu um quadro moderado de desnutrição, não provocando alterações quantitativas, porém levou a alterações no perfil neuronal.

Palavras-chave: desnutrição proteica e vitamínica; duodeno; ratos adultos; ultraestrutura

ABSTRACT. Morphoquantitative study of the duodenum myenteric plexus from rats subjected to lack of proteic and complex B vitamins. This study aims to evaluate the effects of protein and vitamin deficiency on the neurons of the duodenum myenteric plexus of rats. 24 90-day old animals were divided in two groups: control (n=12) and experimental (n=12). During 120 days, the control group received chow with 22% protein level, vitamins and minerals; the experimental group was fed with 8%-protein chow, without vitamin supplementation. After the experimental period, the animals' blood was collected and the duodenum was removed for ultrastructural and morphoquantitative analyses (NADH-d; NADPH-d). The experimental group had reduced total protein, plasma albumin and body weight lower than the control group. The density (NADPH-d) was higher and significant for the experimental group; with the NADH-d technique the neuronal profile differed between the groups. The ultrastructural aspects were similar in both groups. The results allow the conclusion that the diet caused a moderate deficiency, not leading to quantitative alterations, but changed the neuronal profile.

Key words: protein and vitamin deficiency; duodenum; adult rats; ultrastructural.

Introdução

A deficiência nutricional cria condições em que as células perdem sua capacidade de absorção, geração de energia, bem como de mediar o transporte de pequenas moléculas e sintetizar macromoléculas (Serapião, 1985), sendo difícil estabelecer uma definição de desnutrição (ou má nutrição) em virtude da ampla variação do quadro

clínico (Marcondes, 1976). Embora se apresente sob diversas formas, como a obesidade resultante do consumo excessivo de calorias, ou as avitaminoses, devido a uma dieta inadequada ou problemas de absorção, o desvio predominante é a desnutrição protéico-calórica (Xavier, 1999).

Estudos específicos sobre os efeitos da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal no plexo mioentérico do intestino delgado

de ratos evidenciaram uma diminuição do número total de neurônios ganglionares nos animais desnutridos e uma maior concentração de fibras colágenas do tipo III na cápsula ganglionar. Ao empreender a renutrição, notou-se um aumento das fibras colágenas do tipo I, com predomínio nos animais do grupo controle (nutrido) (Gomes, 1999).

Em estudos realizados no jejuno de ratos desnutridos no período de gestação e lactação e renutridos no período de desmame, não foi verificada redução no número de neurônios mioentéricos por área do jejuno, todavia, foram determinados mecanismos que promoveram, nos animais renutridos, acúmulo de material protéico no citoplasma dos neurônios, o que os tornam maiores e fortemente basofílicos (Miranda-Neto et al., 1999).

Dieta com teor protéico de 8% associada à redução de vitaminas do complexo B, em ratos adultos, resultou em menor ganho de peso corporal, acúmulo de gordura corporal, redução de proteína total e albumina, redução da área do colo ascendente e menor densidade de neurônios NADPH-d e NADH-d positivos nos animais do grupo desnutrido (Sant'Ana et al., 2001).

No estômago aglandular de ratos adultos, a desnutrição protéica (8%) levou à redução do órgão, promovendo menor dispersão entre os neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos (Molinari et al., 2002).

Os efeitos de uma desnutrição severa pré e pós-natal no plexo mioentérico do intestino grosso de ratos evidenciaram redução do peso corpóreo dos animais desnutridos, diminuição da área do corpo celular e alterações nos componentes fibroso e elástico dos gânglios. Muito embora a desnutrição tenha sido severa, os autores não observaram diminuição no número total de neurônios (Castelucci et al., 2002). No intestino delgado de ratos submetidos a uma desnutrição protéica pré e pós-natal também foi observada diminuição no tamanho do corpo celular dos neurônios (Brandão et al., 2003).

Utilizando-se de técnicas semelhantes à empregada nesta pesquisa, mas no colo descendente de ratos, observou-se diminuição no peso corporal e na área do colo dos animais do grupo experimental. Em relação à densidade neuronal, nas técnicas de NADH-d e NADPH-d os autores observaram que a mesma foi maior para o grupo desnutrido (Araújo et al., 2003).

Em busca de maiores informações sobre os neurônios mioentéricos de ratos, o objetivo deste trabalho foi avaliar, no duodeno de ratos adultos, as repercussões morfológicas e quantitativas da ingestão

de uma dieta rica em amido, mas com carência de proteínas e vitaminas do complexo B, sobre esses neurônios.

Material e métodos

Utilizaram-se os duodenos de 24 ratos adultos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, com 90 dias de idade, mantidos e mortos de acordo com as normas de conduta ética em experimentação animal (Brasil, 1979). Os animais foram divididos em dois grupos: controle (C; n=12; \pm 297,97g) e experimental (E; n=12; \pm 285,91g) e mantidos em gaiolas individuais com grade no fundo para evitar coprofagia, em ambiente com temperatura constante e ciclos de claro-escuro de 12 horas.

Os animais do grupo C receberam, sem restrições, durante 120 dias, água e ração manufaturada industrialmente com teor protéico de 22%, vitaminas e minerais.

A dieta do grupo E, com teor protéico de 8%, fornecida sem restrições durante 120 dias, foi obtida reduzindo-se o nível protéico da ração industrializada por meio da adição de amido, sem a suplementação de vitaminas. Essa forma de preparação da ração baseou-se em modelos descritos na literatura (Sant'Ana et al., 2001, Araújo et al., 2003).

Após esse período, os animais foram anestesiados com Hypnol (3%) intraperitoneal e coletou-se aleatoriamente, diretamente do ventrículo esquerdo, o sangue de 5 animais de cada grupo. A partir de método enzimático automatizado com sangue heparinizado, realizou-se a dosagem de proteínas totais e albumina plasmática no sangue dos 5 animais de cada grupo. Após, realizou-se laparotomia para a remoção do duodeno (desde o piloro até a flexura duodeno-jejunal); na seqüência, os mesmos tiveram suas áreas decalcadas em folha de papel sobre um negatoscópio e, posteriormente, a área total de cada duodeno foi determinada com o auxílio de um planímetro.

O material coletado foi submetido às técnicas histoquímicas da NADH-d (n=12) (Gabella, 1971, 1987) e NADPH-d (n=6) (Santer, 1994), utilizando-se como acceptor artificial de elétrons o nitro blue tetrazólium (NBT). Os duodenos foram abertos pela margem mesentérica para dissecação da túnica mucosa e tela submucosa; após, os preparados totais de membrana foram montados entre lâmina e lamínula com resina sintética.

Para a avaliação dos aspectos ultraestruturais, retirou-se do duodeno de cada animal (n=6) um segmento de 0,5cm, que foi imediatamente submetido à técnica de microscopia eletrônica de

transmissão (Reynolds, 1963). Posteriormente, o material foi examinado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão.

Para determinar o número total estimado de neurônios, utilizou-se microscópio binocular (objetiva de 40X) e contou-se, na técnica na NADH-d, 40 campos aleatórios em cada duodeno dos animais de cada grupo; na técnica da NADPH-d, contou-se 50 campos aleatórios em cada duodeno dos animais de cada grupo. A área do perfil neuronal foi determinada em 50 neurônios de cada animal, de cada grupo, corado pela técnica da NADH-d; na técnica da NADPH-d, determinou-se a área de 100 neurônios para cada animal de cada grupo. Para a obtenção das áreas neuronais, utilizou-se um equipamento de aquisição de imagem computadorizado. Os mesmos foram classificados tendo como base o tamanho do corpo celular neuronal em pequenos, médios e grandes (Barbosa, 1973; Cook e Burnstock, 1976; Miranda-Neto *et al.*, 2000).

Utilizou-se o teste t de Student para parâmetros sanguíneos, área do duodeno, densidade neuronal, área do corpo celular e número estimado total de neurônios; a variável peso foi submetida à análise de variância com dois fatores: grupo e tempo. O perfil celular dos neurônios nos grupos C e E foi comparado por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

Resultados

Os animais do grupo controle (C), aos 90 dias, pesaram em média 297,97g e, aos 210 dias, 440,48g. Os do grupo experimental (E), aos 90 dias, 285,91g e, aos 210 dias, 397,83g. A diferença entre as médias dos pesos finais dos animais dos dois grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Com relação ao comprimento e área do duodeno, encontrou-se diferença estatisticamente significativa no comprimento ($p = 0,025$), contudo a área não apresentou diferença estatística significativa ($p = 0,104$).

Mediante a dosagem bioquímica no sangue dos animais C e E, verificou-se que houve redução significativa no valor médio de proteínas totais e de albumina sérica nos animais do grupo E (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão dos valores sanguíneos de proteína total e albumina no plasma de ratos com 210 dias de idade dos grupos C e E.

Grupo	Proteína total ¹ (g/dL)	Albumina (g/dL)
Grupo C	6,46 ± 0,11	3,7 ± 0,4
Grupo E	5,8 ± 0,07*	2,5 ± 0,53**
Valor de Referência ²	6,3 - 8,6	3,3 - 4,9

¹Dosagens realizadas a partir do Método Enzimático Automatizado.

n = 5 animais em cada grupo.

Valores seguidos por asterisco (*) diferem estatisticamente ($p = 0,025$; $p = 0,03$ **).

²Fonte: Hillyer & Quesenberry, 1997.

Em ambos os grupos, os neurônios NADH-d apresentaram-se com diferentes tamanhos e formatos e com citoplasma bem evidenciado ou pouco reativo (Figura 1). A densidade ($E = 8.514,03 \pm 1.662,3$; $C = 9.183,67 \pm 1.231,9$) e número estimado total de neurônios ($E = 86.843 \pm 10.358$; $C = 126.122 \pm 24.390$) não diferiram entre os grupos; o perfil neuronal, em ambos os grupos, variou entre 70 a $510 \mu\text{m}^2$, sendo que a média para o grupo C foi de $264,8 \pm 84,1 \mu\text{m}^2$, enquanto os animais do grupo E, uma média de $284,7 \pm 87,8 \mu\text{m}^2$. O teste de Kolmogorov-Smirnov detectou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,021$).

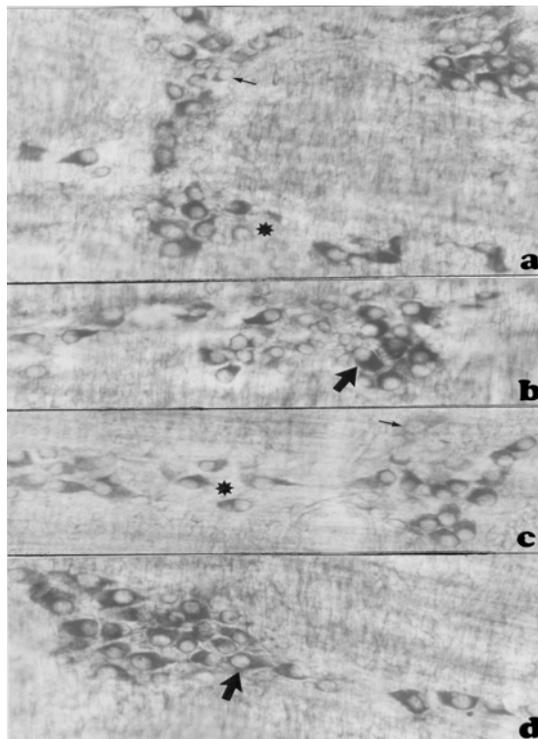


Figura 1. Gânglios do plexo mioentérico do duodeno de ratos dos grupos Controle (a, b) e Experimental (c, d) nos quais se observa, em ambos os grupos, neurônios com diferentes tamanhos e formatos, com citoplasma bem evidenciado (setas maiores) ou pouco reativo (setas menores). Notar a presença de espaços (*), ocupados por células não reativas ao método. (NADH. a - d- 345X)

Na técnica da NADPH-d, as malhas terciárias do plexo mostraram-se pouco marcadas no grupo E (Figura 2), a densidade foi significante entre os grupos ($E=7.843,5 \pm 741,9$; $C=6.234,7 \pm 495,8$; $p=0,035$), todavia, o número estimado total de neurônios ($E=80.004 \pm 9.542$; $E=85.623 \pm 16.558$) não diferiu. O perfil neuronal, em ambos os grupos, variou entre 200 a $1600\mu\text{m}^2$, sendo que a média para o grupo C foi de $513,2 \pm 363,1\mu\text{m}^2$, enquanto os animais do grupo E, uma média de $487,6 \pm 264,4\mu\text{m}^2$. O teste de Kolmogorov-Smirnov não detectou diferença significante entre os grupos.

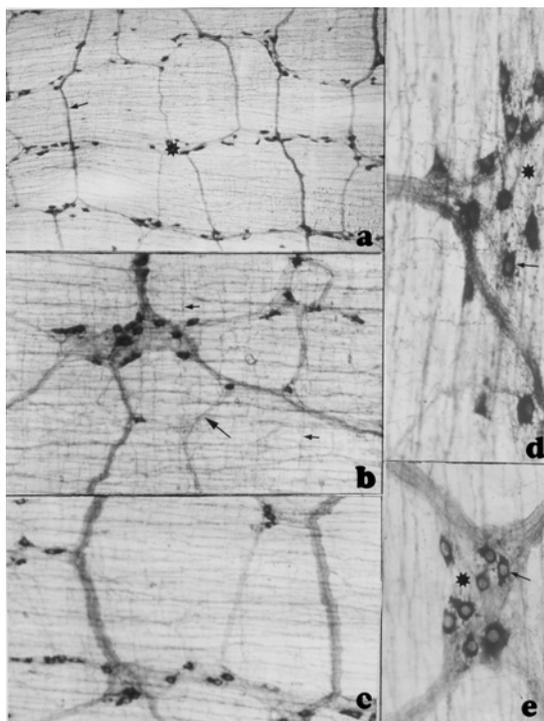


Figura 2. Plexo mioentérico do duodeno de rato evidenciado pela técnica da NADPH. a- Vista geral do plexo, na qual se observam as malhas (seta) e os gânglios (*) na intersecção das mesmas. b- Plexo de animal do grupo C no qual se notam as malhas secundária (seta maior) e terciárias (setas menores), estas apresentando varicosidades em sua extensão. c- Plexo de animal do grupo E com as malhas terciárias pouco evidentes. d, e, f - Gânglios do plexo de animais respectivamente dos grupos C e E apresentando espaços ocupados por neurônios não-reativos à técnica NADPH em seu interior (*). Notar as diferenças na intensidade de marcação dos neurônios (setas) entre os grupos C e E. (a- 56X; b, c- 135X; d, e- 275X).

Os aspectos ultraestruturais dos neurônios não foram diferentes entre os grupos e estão descritos nas Figura 3.

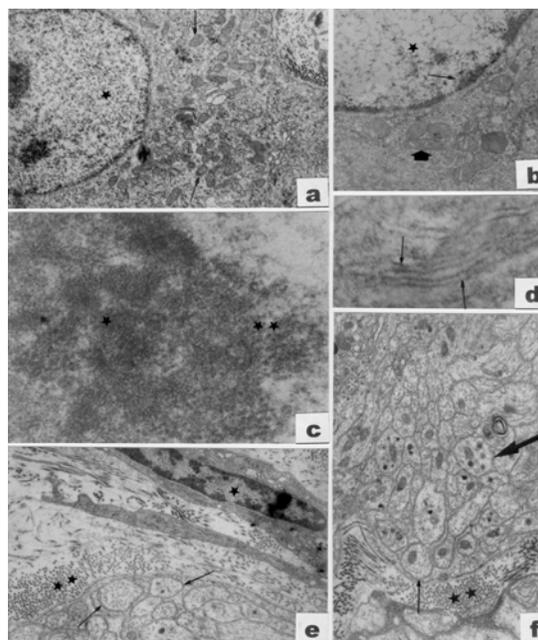


Figura 3. a. Neurônio do plexo mioentérico do duodeno de animal do grupo C, no qual se verifica o núcleo com cromatina nuclear de aspecto homogêneo (*) e membrana nuclear preservada. Observar a grande quantidade de mitocôndrias no interior do citoplasma (setas); b. Neurônio do plexo mioentérico do duodeno de animal do grupo E, evidenciando-se a cromatina nuclear (*) formando condensações próximo à membrana nuclear (seta menor). Notar, como nos animais do grupo C, um grande número de mitocôndrias com características normais no citoplasma dessas células (seta maior); c- Zonas fibrilar (*) e granular (**) dos nucléolos de animais do grupo E, com características normais; d- retículo endoplasmático rugoso com membranas de aspecto normal e ribossomas (setas) presente nos neurônios ganglionares dos animais do grupo E; e, f- gânglios de animais do grupo C e E, respectivamente, nos quais se verifica a cápsula ganglionar formada por fibrilas colágenas (**) e terminações nervosas com vesículas granulares pequenas (setas menores) e grandes (setas maiores). Observar a presença, na cápsula, de células semelhantes a fibroblastos (*). (a, b- 12.000x; c- 80.000x; d- 60.000x; e, f- 50.000x).

Discussão

Os animais do grupo controle, recebendo dieta com teor de 22% de proteína, vitaminas e minerais, tiveram um ganho de peso de 47,8%, enquanto os do grupo experimental, que receberam dieta com teor de 8% de proteína e sem a suplementação de vitaminas do complexo B, tiveram um ganho de 39,1% o que sugere que o excesso de amido presente na dieta não foi suficiente para permitir o desenvolvimento normal dos animais. Dados semelhantes foram constatados em outros experimentos, em que os grupos de ratos desnutridos apresentaram peso corporal inferior aos dos grupos controle, na ordem de 37,9% (Fiorini et

al., 1999), 35,1% (Sant'Ana *et al.*, 1997), 35% (Brandão *et al.*, 2003), 14,8% (Araújo *et al.*, 2003).

Ao comparar-se o número estimado total de neurônios NADH-d e NADPH-d entre os grupos, não se encontraram diferenças estatisticamente significantes, evidenciando que apesar de a adição de amido à dieta ter diminuído a concentração de vitaminas do complexo B e proteínas, essas substâncias devem ter permanecido em concentrações suficientes a fim de proporcionar condições estáveis de funcionamento para essas subpopulações de neurônios. Os aspectos ultraestruturais confirmam esses dados, pois o núcleo e o citoplasma dos animais dos grupos C e E mostraram-se semelhantes.

Os achados deste trabalho, no que diz respeito aos aspectos ultraestruturais, são corroborados pelos encontrados por Natali *et al.*, 2000 ao avaliarem as características ultraestruturais dos gânglios mioentérico do duodeno de ratos adultos. Estes autores observaram que os neurônios apresentam núcleo grande e oval, nucleoplasma e cromatina homogeneamente distribuída, nucléolo proeminente, ribossomos e polirribossomos livres, e retículo endoplasmático bem desenvolvido e mitocôndrias de tamanho variados e dispersas por todo o citoplasma.

Em relação aos achados sobre a população de neurônios NADH-d positivos, dados semelhantes foram evidenciados no estômago aglandular de ratos da mesma espécie e idade.

Entretanto, em outros experimentos, foram encontradas reduções significantes no número de neurônios mioentéricos de ratos do grupo experimental (Torrejais *et al.*, 1995; Meilus *et al.*, 1998; Gomes, 1999; Brandão *et al.*, 2003;), o que leva a deprender que a diferença pode estar relacionada ao tipo de desnutrição empregado pelos diferentes autores e também ao período de vida do animal que foi submetido ao processo de desnutrição.

Em virtude da grande variabilidade no tamanho dos neurônios presentes na parede do trato digestório, os mesmos foram classificados, tendo como base o tamanho do corpo celular neuronal em pequenos, médios e grandes (Barbosa, 1973; Cook e Burnstock, 1976; Miranda-Neto *et al.*, 2000). No presente experimento, verificou-se um predomínio, em ambas as técnicas, de neurônios médios e grandes. No entanto, a relação entre o predomínio de uma população neuronal, o tamanho do corpo celular e o período do desenvolvimento do animal no plexo mioentérico de ratos adultos e recém-nascidos foram analisados e concluiu-se que a população predominante nos animais-recém

nascidos é a de neurônios pequenos, enquanto em animais adultos, embora os neurônios pequenos estivessem presentes, os neurônios maiores constituíram o principal componente da população ganglionar (Gabella, 1971), dados que explicam os encontrados no presente trabalho.

Ao comparar-se o perfil celular, verificou-se que na técnica da NADH-d os neurônios apresentaram-se com um perfil celular maior e estatisticamente significativo nos animais do grupo E, o que pode ser sugestivo de que tenha ocorrido um possível mecanismo adaptativo nessa subpopulação de neurônios, haja vista que, em condições de desnutrição, o plexo mioentérico atua em seu limite mínimo necessário para a homeostase visceral, levando os neurônios com menor atividade metabólica a tornarem-se ativos para suprir a falta daqueles perdidos, aumentando seus processos bioquímicos em uma ação adaptativa (Castelucci *et al.*, 2002).

Conclusão

Com base na metodologia empregada e face aos resultados obtidos, pode-se afirmar que a dieta utilizada promoveu um quadro moderado de desnutrição que não foi suficiente para provocar alterações quantitativas significantes, porém houve aumento do perfil do corpo celular nos neurônios mioentéricos NADH-d positivos dos animais do grupo E.

Referências

- ARAÚJO, E. J. A. *et al.* Regional differences in the number and type of myenteric neurons in the ascending colon of rats. *Arq. Neurops.*, São Paulo, v. 61, n. 2A, p. 220-225, 2003.
- BARBOSA, A. J. A. Auerbach's plexus of the albino rat. I. Quantitative study of the ganglia and nerve cells in the caecum and colon. *Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 6, p. 253-262, 1973.
- BRANDÃO, M. C. S. *et al.* Effects of pré-and postnatal protein energy deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weanling rats. *Nutr. Res.*, New York, v. 23, p. 215-223, 2003.
- BRASIL, Lei n.6.638,8 de Maio de 1979. Normas para a prática didático-científica da viviseção de animais e determinação de outras providências., p. 43:416, 1979.
- CASTELUCCI, P. *et al.* Effects of pre-and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. *Cell Tissue Res.*, Berlin, v. 310, p. 1-7, 2002.
- COOK, R. D.; BURNSTOCK, G. The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. I. Neuronal elements. *J. Neurocytol.*, Dordrecht, v. 5, p. 171-194, 1976.

- FIORINI, A. et al. Quantitative morphological analysis of the myenteric neurons of the ileum in rats under experimental desnutrition. *Acta Scientiarum*, Maringá, n. 21, p. 409-413, 1999.
- GABELLA, G. Neuron size number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat.*, Cambridge, v. 109, n. 1, p. 81-95, 1971.
- GABELLA, G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pig and sheep. *Neuroscience*, Kidlington, v. 22, n. 2, p. 737-752, 1987.
- GOMES, O. A. *Repercussões morfológicas da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal no plexo mioentérico do intestino delgado de ratos*. 1999. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- HILLYER, E. V.; QUESENBERRY, K. E. *Ferrets, rabbits and rodents clinical medicine and surgery*. London:Saunders, 1997.
- MARCONDES, E. *Desnutrição*. São Paulo: Sarvier, 1976.
- MIRANDA-NETO, M. H. et al. Morphological and quantitative study of the myenteric neurons of the jejunum of malnourished rats (*Rattus norvegicus*). *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v. 57, n. 2-B, p. 387-391, 1999.
- MIRANDA-NETO, M. H. et al. Evaluation of the areas of neuronal cell bodies and nuclei in the myenteric plexus of the duodenum of adult rats. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v. 58, n. 2-A, p. 246-251, 2000.
- MEILUS, M. et al. Study of the myenteric plexus of the ileum of rats subjected to protein undernutrition. *Rev Chil Anat.*, Santiago, n. 16, p. 9-14, 1998.
- MOLINARI, S. L. et al. NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the aglandular region of the stomach of rats (*Rattus norvegicus*) subjected to desnutrition. *Rev. Chil. Anat.*, Santiago, v. 20, n. 1, p. 19-23, 2002.
- NATALI, M. R. M. et al. Ultrastructural features of myenteric ganglia of adult wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Anat. Histol. Embryol.*, Berlin, v. 29, p. 393-397, 2000.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, Rome, v. 17, p. 208, 1963.
- SANT'ANA, D. M. G. et al. Morphologica and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon rats subjected to proteic desnutrition. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, n. 55, p. 687-695, 1997.
- SANT'ANA, D. M. G. et al. Effects of protein and vitamin B deficiency on blood parameters and myenteric neurons of the colon of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v. 59, n. 3-A, p. 493-498, 2001.
- SANTER, R. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, Amsterdam, v. 49, p. 115-121, 1994.
- SERAPIÃO, C. J. *Desnutrição Intra-Uterina e Pós-Natal*. São Paulo: Panamed, 1985.
- TORREJAIS, M. M. et al. Effects of protein malnutrition after breast-feeding on the morphology of the intestinal wall and myenteric neurons of the ileum rats. *Revista Unimar*, Maringá, v. 17, n. 2, p. 315-327, 1995.
- XAVIER, J. G. *Repercussões estruturais da desnutrição protéica e renutrição em tecidos linfo-hematopoiéticos de camundongos*. 1999. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

Received on February 16, 2004.

Accepted on June 22, 2004.