

Análise Histológica do Ovário de Ratas Submetidas à Ausência de Luz

Histological Analysis of the Ovary of Female Rats Submitted to Light Absence

KATHARINE RAQUEL PEREIRA DOS SANTOS¹
ÁLVARO AGUIAR COELHO TEIXEIRA²
VALÉRIA WANDERLEY TEIXEIRA²
EULÂMPIO JOSÉ DA SILVA NETO³

RESUMO

Objetivo: Obter informações da histologia e do desenvolvimento dos folículos ovarianos de ratas mantidas na ausência de luz. *Material e Métodos:* Foram utilizadas 10 ratas albinas, as quais foram divididas em dois grupos de cinco animais: GRUPO I – ratas mantidas no ciclo claro/escuro 12/12h, por três meses (Controle), e GRUPO II – ratas mantidas na ausência de luz por três meses. *Resultados:* Nos animais do grupo II foi observado, na região cortical aos ovários, predominância de corpos lúteos e alguns folículos ovarianos em fase inicial de desenvolvimento, enquanto que na região medular foram evidenciadas poucas células intersticiais dispersas no estroma ovariano. *Conclusão:* A ausência de luz pode acarretar um aumento do nível de melatonina circulante no sangue e conseqüentemente, parece contribuir para a manutenção de corpos lúteos e diminuir a atividade de síntese de esteróides das células intersticiais do ovário.

DESCRITORES

Ovário. Histologia. Melatonina. Fotoperíodo.

SUMMARY

Objective: This study had the objective of acquiring information about the histology and development of ovarian follicles of female rats kept in the absence of light. *Material and Methods:* 10 albino female rats were used and divided into two groups of five: GROUP I – Female rats kept in the dark-light cycle 12/12 hours, for three months (Control), and GROUP II – female rats kept in the absence of light for three months. *Results:* in the rats of group II, a predominance of corpus luteum and some ovarian follicles in the initial phase of development was observed in the cortical area to the ovaries, while few dispersed interstitial cells were evidenced in the ovarian stroma, in the medullar area. *Conclusion:* The absence of light can bring about an increase in the level of melatonin in the blood and consequently, it can contribute to the maintenance of corpus luteum and reduce the activity of synthesis of steroids present in the interstitial cells of the ovary.

DESCRIPTORS

Ovaries. Histology. Melatonin. Photoperiod.

1 Bióloga.

2 Professor Adjunto do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE.

3 Professor Adjunto do Departamento de Morfologia/CCS/UFPB.

A maturação dos folículos ovarianos depende da liberação de hormônios gonadotróficos (FSH e LH) produzidos pela adeno-hipófise (PAPKOFF *et al.*, 1967; PEDERSEN e PETERS, 1968). Entretanto, vários fatores podem alterar a fisiologia e histologia ovariana em roedores. Dentre esses fatores, podemos citar a melatonina, um hormônio sintetizado pela glândula pineal (REITER, 1991; ALEANDRI *et al.*, 1996).

A melatonina desempenha nos mamíferos, além de outras funções, um papel de substância anti-gonadotrófica estando envolvida na regulação das funções reprodutivas (REITER, 1991). Sabe-se que a regulação da secreção de melatonina está relacionada, em roedores, com a intensidade e o tempo de exposição à luz (GAUER e MASON-PÉVET, 1992; REITER, 2003). Quanto maior o estímulo luminoso, menor a sua síntese, pois a exposição à luz inibe a atividade das fibras simpáticas que inervam a pineal (FRITZ e SPEROFF, 1982).

Quando ratas são expostas a um estímulo luminoso contínuo entram em estado de estro permanente, sendo que este pode ser abolido injetando-se extratos de pineal bovina (WURTMAN *et al.*, 1963). Ao contrário, animais submetidos a curtos fotoperíodos apresentam uma frequência estral reduzida e menor peso gonadal (TAMARKIN *et al.*, 1985). Deve ser mencionado ainda que ratas mantidas na ausência de luz apresentam uma diminuição na incidência da fase de estro e aumento da incidência da fase de metaestro (SANTOS *et al.*, 2003). Enquanto ratas pinealectomizadas ou mantidas em iluminação contínua, por aproximadamente três meses, desenvolvem ovários policísticos, por entrarem em estro permanente (PRATA LIMA *et al.*, 1995; BARACAT, *et al.*, 2000).

Portanto, diante do exposto, e considerando que a ausência de luz estimula a síntese de melatonina, este trabalho teve como objetivo obter informações sobre a histologia e o desenvolvimento dos folículos ovarianos em ratas submetidas à ausência de luz.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 10 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar com 40-50 dias de idade, pesando aproximadamente 150g, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Após um período de adaptação de 10 dias, os animais foram divididos em dois grupos: GRUPO I - Ratas mantidas no ciclo 12h claro/12h escuro (controle) e

The maturation of the ovarian follicles depends on the liberation of gonadotropic hormones (FSH and LH) produced by the adenohypophysis (PAPKOFF *et al.*, 1967; PEDERSEN and PETERS, 1968). However, several factors can alter the ovarian physiology and histology in rodents. Among these factors, we can mention the melatonin, a hormone that is synthesized by the pineal gland (REITER, 1991; ALEANDRI *et al.*, 1996).

The melatonin has in the mammals, besides other functions, a role of anti-gonadotropic substance and is involved in the regulation of reproductive functions (REITER, 1991). It is known that the regulation of the melatonin secretion is related, in rodents, to the intensity and the time of exposition to light (GAUER and MASON-PÉVET, 1992; REITER, 2003). The longer the light stimulus is, the less its synthesis is, because the exposition to light inhibits the activity of sympathetic fibers that innervate the pineal gland (FRITZ and SPEROFF, 1982).

When female rats are exposed to a continuous light stimulus, they get into the state of permanent estrus, which can be suppressed by the injection of bovine pineal extracts (WURTMAN *et al.*, 1963). On the contrary, animals submitted to short photoperiods present a reduced frequency of estrus and a lower gonadal weight (TAMARKIN *et al.*, 1985). It should yet be mentioned that female rats kept in the absence of light present a decrease in the incidence of the estrus phase and increase in the metaestrus phase (SANTOS *et al.*, 2003) while pinealectomized female rats or those kept under continuous illumination, for approximately three months, develop polycystic ovaries, for getting into permanent estrus (PRATA LIMA *et al.*, 1995; BARACAT, *et al.*, 2000).

Therefore, in face of what is exposed, and considering that the absence of light stimulates the synthesis of melatonin, this work has the aim of obtaining information about histology and the development of ovarian follicles in female rats submitted to the absence of light.

MATERIAL AND METHODS

We used 10 albino female rats (*Rattus norvegicus albinus*), from the Wistar race with 40-50 days old, weighing approximately 150 g, coming from the Vivarium of the Department of Animal Morphology and Physiology, at Universidade Federal Rural de Pernambuco. After an adaptation period of 10 days, the animals were divided into two groups: GROUP I - Female rats kept in the 12h light/12h dark cycle (control) and

GRUPO II - Ratas mantidas na ausência de luz. Todos os animais permaneceram nestas condições por três meses.

Ao final do experimento, todos os animais foram submetidos a exame colpocitológico para determinação da fase do ciclo estral. Após esses procedimentos as ratas que se encontravam na fase de estro foram anestesiadas para a retirada dos ovários. Para isso utilizou-se o hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg) por via intramuscular. Em seguida foi realizada a abertura da cavidade abdominal desde o púbis até o rebordo das costelas; retirando-se em seguida os ovários, os quais foram recortados longitudinalmente e mergulhados imediatamente em líquido de Bouïn, permanecendo no mesmo por 48 horas. Após esse período, o material foi desidratado em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizado em dois banhos de xilol, impregnados (dois banhos) e incluídos em paraplast, seguindo a metodologia de RIEDER e SCHMIDT (1987). Os blocos obtidos foram cortados em micrótomo ajustado para 5mm. Os cortes foram corados por H.E. e analisados através da microscopia de luz. Para a eutanásia dos animais utilizou-se o aprofundamento da anestesia.

Ausência de Luz: foi obtida utilizando-se uma sala de, aproximadamente, 3 m² totalmente escura, sendo a única fonte de luminosidade uma lâmpada marca Philips (lustre color E27), vermelha, de 15w, a qual só era acesa no momento da limpeza das gaiolas, onde os animais do grupo II permaneceram durante o experimento.

RESULTADOS

Os resultados mostraram que nas fêmeas do grupo I, os ovários apresentaram-se revestidos por epitélio simples cúbico, repousando sobre a albugínea ovariana, com a região cortical e medular bem definidas. Na região cortical foram observados vários folículos ovarianos em diversos estágios de desenvolvimento, com predominância dos folículos terciários (Figura 1), além de alguns corpos lúteos. A região medular mostrou-se constituída por tecido conjuntivo, ricamente vascularizado, com vários fibroblastos, uma fina rede de fibras colágenas, além de numerosas células intersticiais com citoplasma claro, indicando atividade de síntese de esteróides, as quais em algumas áreas estão agrupadas formando as glândulas intersticiais (Figura 2). Foi observado ainda a presença de células do hilo, com citoplasma granular e acidófilo, localizadas próximas aos vasos sanguíneos (Figura 3).

GROUP II – Female rats kept in the absence of light. All the animals stayed under those conditions for three months.

At the end of the experiment, all of the animals were submitted to a cervicovaginal cytology to determine the phase of the estrus cycle. After those procedures, the female rats that were in the phase of estrus were anesthetized in order to have their ovaries taken out. For that, Ketaminhydrochlorid (80 mg/kg) and xylazine (6.0 mg/kg) were used by intramuscular means. Then, the opening of the abdominal cavity was done, from the pubis to the edge of the ribs, in order to take out the ovaries, which were longitudinally cut and immediately immersed in Bouïn liquid, staying there for 48 hours. After this period, the material was dehydrated in ethyl alcohol in increasing concentrations, cleared with two xylol showers impregnated and included in paraplast, following the methodology of RIEDER and SCHMIDT (1987). The blocks obtained were cut in a microtome which was adjusted for 5µm. The cuts were colored by H.E. and analyzed through light microscopy. For the euthanasia of the animals, the anesthesia deepening was used.

Absence of light: it was obtained using a room of approximately 3m² totally dark and having as its only light source a light bulb of the brand Philips (luster color E27) red, of 15 w, which was only lit at the moment of the cleaning of cages, where the animals of group II stayed during the experiment.

RESULTS

The results showed that in the female rats of group I, the ovaries were covered with simple cubic epithelial tissue, resting over the ovarian albuginea, with cortical and well-defined medullar regions. In the cortical region, many ovarian follicles in various stages of development we observed, with predominance of the tertiary follicles (Figure I), besides some corpus luteum. The medullar region was constituted by connective tissue, richly vascularized, with many fibroblasts, a thin web of collagen fibers, besides several interstitial cells with clear cytoplasm, indicating activity of synthesis of steroids, which in some areas are grouped forming the interstitial glands (Figure 2). We also observed the presence of hilum cells, with granular and acidophilic cytoplasm, located next to the blood vessels (Figure 3).

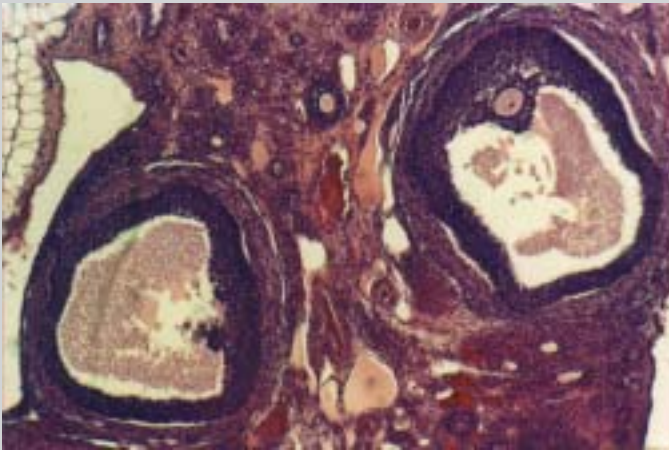


Figura 1 - Fotomicrografia mostrando região cortical do ovário de rata pertencente ao grupo I (fase de estro). Notar folículos terciários (F) H.E. \pm 690 X.

Figure 1 – Photomicrography showing cortical region of the ovary of the female rat pertaining to group I (estrus phase). Notice tertiary follicles (F) H.E. \pm 690 X.

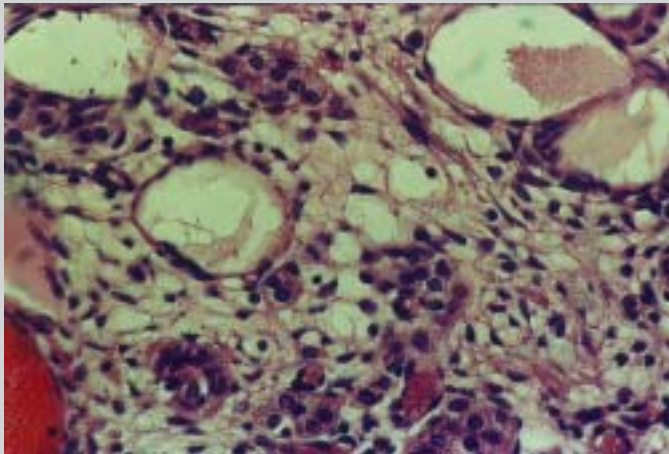


Figura 2 - Fotomicrografia mostrando região medular do ovário de rata pertencente ao grupo I (fase de estro). Notar grande quantidade de células intersticiais (seta), às vezes formando glândulas intersticiais (GI) H.E. \pm 1700 X.

Figure 2 – Photomicrography showing medullar region of the ovary of the female rat pertaining to group I (estrus phase). Notice the great amount of interstitial cells (arrow), sometimes forming interstitial glands (GI) H.E. \pm 1700 X.

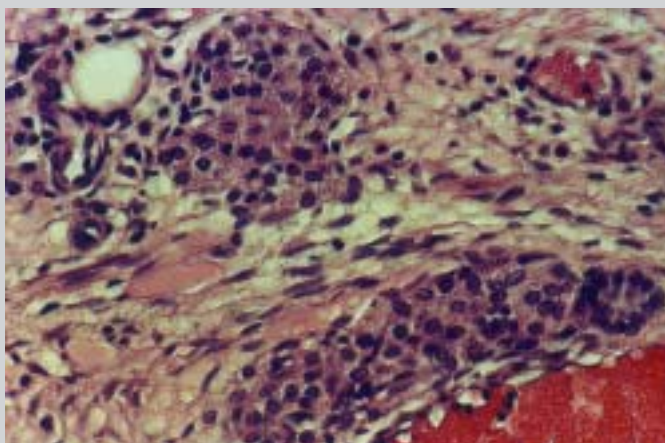


Figura 3 - Fotomicrografia mostrando região medular do ovário de rata pertencente ao grupo I (fase de estro). Notar a presença de células do hilo agrupadas (CH), com citoplasma granular e bastante eosinófilo. H.E. \pm 1700 X.

Figure 3 – Photomicrography showing medullar region of the ovary of the female rat pertaining to group I (estrus phase). Notice the presence of hilum cells grouped (CH), with granular cytoplasm and a lot of eosinophils. H.E. \pm 1700 X

Nas fêmeas do grupo II, os ovários mostraram-se também revestidos por epitélio simples cúbico, estando apoiado na túnica albugínea. As regiões cortical e medular apresentaram-se bem definidas. Na região cortical, observou-se a predominância de grande quantidade de corpos lúteos e alguns folículos ovarianos em fase inicial de desenvolvimento (Figura 4). Foi observada uma redução de folículos terciários quando comparado ao grupo I. A região medular mostrou-se constituída por tecido conjuntivo frouxo, com vários fibroblastos, poucas células intersticiais, as quais encontram-se dispersas no estroma ovariano, indicando pouca atividade estrogênica (Figura 5). Foi observado ainda, algumas células do hilo (Figura 6).

In the female rats of group II, the ovaries were also covered with simple cubic epithelium, supported on the tunica albuginea. The cortical and medullar regions were well-defined. In the cortical region, there was a predominance of a great amount of corpus luteum and some ovarian follicles in the initial phase of development (Figure 4). A reduction of tertiary follicles was observed, when compared to group I. The medullar region was constituted by loose connective tissue, with many fibroblasts, a few interstitial cells, which are sparse in the ovarian stroma, indication low estrogenic activity (Figure 5). It was observed, yet, some hilum cells (Figure 6).

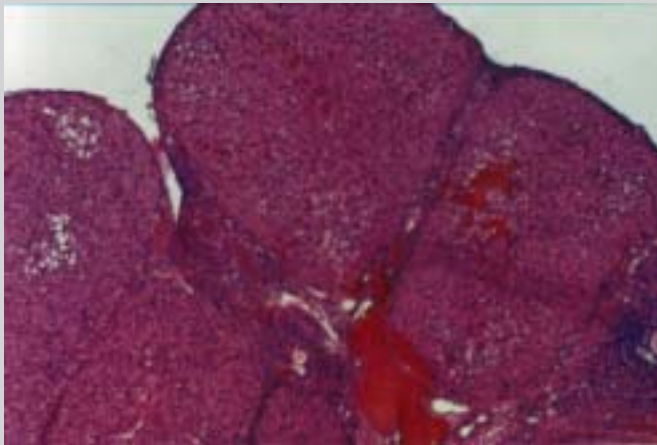


Figura 4 - Fotomicrografia mostrando região cortical do ovário de rata pertencente ao grupo II (fase de estro). Notar grande quantidade de corpos lúteos (CL) H.E. \pm 170 X.

Figure 4 – Photomicrography showing cortical region of the ovary of the female rat pertaining to group II (estrus phase). Notice great amount of corpus luteum (CL) H.E. \pm 170 X.

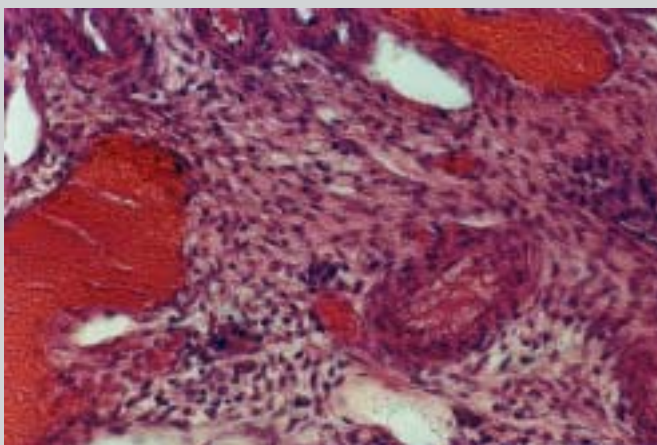


Figura 5 - Fotomicrografia mostrando região medular do ovário de rata pertencente ao grupo II (fase de estro). Notar células intersticiais (seta) dispersas no estroma ovariano. H.E. 1700 X.

Figure 5 – Photomicrography showing medullar region of the ovary of the female rat pertaining to group II (estrus phase). Notice sparse interstitial cells (arrow) in the ovarian stroma. H.E. \pm 1700 X.

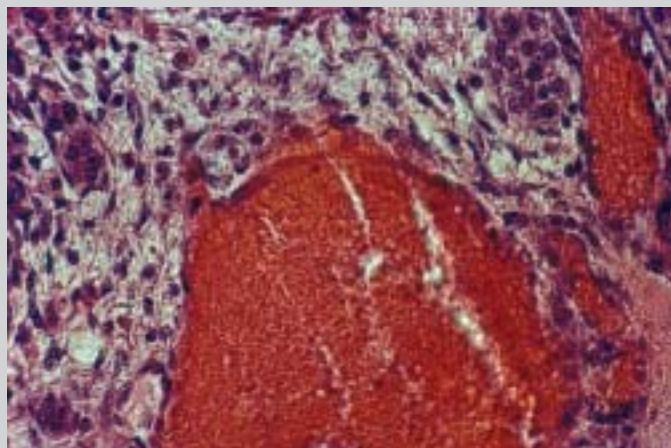


Figura 6 - Fotomicrografia mostrando região medular do ovário de rata pertencente ao grupo I (controle, fase de estro). Notar a presença de células do hilo (CH), próximas aos vasos sanguíneos. H.E. \pm 1700 X.

Figure 6 – Photomicrography showing medullar region of the ovary of the female rat pertaining to group I (control, estrus phase). Notice the presence of hilum cells (CH) next to the blood vessels. H.E. \pm 1700 X

DISCUSSÃO

Segundo LONG e EVANS (1922), durante o ciclo estral da rata, três ou mais gerações de corpo lúteo podem estar presentes no ovário provenientes dos vários ciclos ovulatórios destes animais.

BOLING (1942); LONG e EVANS (1922) e SMITH *et al.* (1975) relatam que a formação do corpo lúteo ocorre no estro, alcançando sua máxima dimensão no diestro, sendo mantido até o metaestro do ciclo seguinte. No diestro do próximo ciclo, o corpo lúteo regride bruscamente devido à ausência do suporte luteotrófico. Com isso, a secreção de progesterona declina durante o diestro e uma nova ovulação ocorre posteriormente. Assim, a fase luteal em ratas é atípica, uma vez que o corpo lúteo de ratas que não acasalaram secretam baixos níveis de progesterona por somente um a dois dias. Isto serve como base para o curto ciclo dos roedores.

Segundo pesquisas realizadas por BARATTA e TAMANINI (1992) e DUROTOYE *et al.* (1997), em ovinos, a melatonina, através de mecanismos de ação diferentes ao da gonadotrofina coriônica (HCG) e do hormônio luteinizante (LH), pode agir diretamente no corpo lúteo estimulando as células da granulosa a aumentarem a produção de progesterona. Isto ocorre devido a uma atividade sinérgica entre melatonina e hormônio luteinizante, bem como da habilidade das células da granulosa para secretar progesterona dependendo do seu grau de diferenciação.

A análise morfológica dos ovários das fêmeas do grupo II mostrou uma predominância de corpos lúteos e uma acentuada diminuição das células intersticiais. Esse fato pode estar relacionado à presença

DISCUSSION

According to LONG and EVANS (1922), during the estrus cycle of the female rat, three or more generations of corpus luteum may be present in the ovary, proceeding from many ovulation cycles of these animals.

BLING (1942); LONG and EVANS (1922) and SMITH *et al.*, (1975), report that the formation of the corpus luteum occurs in the estrus, reaching its maximum dimension in the diestrus, maintaining it until the metaestrus of the following cycle. In the diestrus of the following cycle, the corpus luteum recedes abruptly due to the lack of luteotrophic support. So, the progesterone secretion decreases during the diestrus and a new ovulation occurs subsequently. This way, the luteal phase in female rats is atypical, once the corpus luteum of female rats that have not mated secrete low levels of progesterone for only one or two days. This works as a base for the short cycle of the rodents.

According to researches done by BARATTA and TAMANINI (1992) and DUROTOYE *et al.* (1997) in ovine animals, the melatonin, through action mechanisms which are different from those of the chorionic gonadotrophin (HCG) and Luteinizing hormone (LH), can work directly in the corpus luteum stimulating the granulosa cells to increase the production of progesterone. That happens due to a synergic activity between the melatonin and Luteinizing Hormone, as well as to the ability of the granulosa cells to secrete progesterone depending on its degree of differentiation.

The morphological analysis of the ovaries of the female rats of group II showed a predominance of corpus luteum and accentuated diminution of interstitial cells.

prolongada da melatonina, o que pode ter contribuído para a manutenção desses corpos lúteos, os quais provavelmente foram formados em ciclos anteriores.

BARACAT *et al.* (2000) em seus experimentos mostraram que ratas pinealectomizadas ou submetidas à iluminação contínua apresentaram ausência de corpos lúteos e um grande número de cistos envolvidos pela teca interna e células intersticiais. Enquanto os animais tratados com melatonina exibiram características contrárias, semelhantes às observadas nas fêmeas do grupo II do presente estudo.

Com relação à diminuição das células intersticiais, pode ser explicado pelo fato de ter havido uma diminuição do estrógeno circulante em decorrência da presença prolongada da melatonina, pois, segundo OZAKI *et al.* (1978), a ooforectomia em ratas eleva a concentração de melatonina no plasma, sendo este efeito suprimido pela administração de estrogênio.

Portanto, a ausência de luz pode, conseqüentemente, acarretar um aumento do nível de melatonina circulante no sangue. Isto, de alguma forma, contribuiu para a manutenção de corpos lúteos, bem como a inibição da atividade de síntese de esteróides pelas células intersticiais, levando assim a uma provável diminuição dos níveis de estrógeno. Este modelo biológico deve ser, a nosso ver, melhor explorado, com o intuito de se estudar a gênese dos ovários policísticos, pois ao que parece, a melatonina teria a propriedade de bloquear a maturação dos folículos ovarianos.

This fact may be related to the prolonged presence of melatonin, which may have contributed to the maintenance of these corpus luteum, which were probably formed in previous cycles.

BARACAT *et al.*, (2000) in their experiments showed that pinealectomized female rats or rats submitted to continuous light presented lack a corpus luteum and a great number of cysts involved by the internal theca and interstitial cells while the animals treated with melatonin showed opposite characteristics, similar to the ones observed in the female rats of group II of the present study.

Regarding the diminution of the interstitial cells, it can be explained by the fact that there was a diminution in the circulation estrogen as a consequence of the prolonged presence of melatonin, because, according to OZAKI *et al.* (1998), the oophorectomy in female rats increases the melatonin concentration in the plasma and this effect can be suppressed by the administration of estrogen.

Therefore, the absence of light can, consequently, cause an increase in the level of melatonin circulating in the blood. This, in some way, contributes to the maintenance of the corpus luteum, as well as to the inhibition of the steroid synthesis activity by the interstitial cells, causing, this way, a probable diminution in the levels of estrogen. This biological model should be, in our estimation, better explored, for the purpose of studying the genesis of the polycystic ovaries, because as it seems to us, the melatonin would have the property of blocking the maturation of ovarian follicles.

REFERÊNCIAS

References

1. ALEANDRI V, SPINA V, MORINI A. The pineal gland and reproduction. *Human Reproduction Update*, 2(3): 225-235, 1996.
2. BARACAT EC, SOARES Jr. JM, LANG CE, SIMÕES MJ, HAIDAR MA, DAIR EI, RODRIGUES DE LIMAG, MARKUS R. Ovarian morphology of adult rats submitted to continuous light or pinealectomy after melatonin administration. *International Journal of Gynecology & obstetrics*, 70(1):A132-A133, 2000.
3. BARATTA M, TAMANINI C. Effect of melatonin on the in vitro secretion of progesterone and estradiol 17 beta by ovine granulosa cells. *Acta Endocrinology*, 127(4): 366-370, 1992.
4. BOLING JL. Growth and regression of corpo lutea during the normal estrous cycle of the rat. *Anat. Rec.* 82(s.n):131-145, 1942.
5. DUROTOYE LA, WEBLEY GE, RODWAY RG. Stimulation of the production of progesterone by the corpus luteum of the ewe by the perfusion of melatonin in vivo and by treatment of granulosa cells with melatonin in vitro. *Res. Vet. Sci.* 62(2):87-91, 1997.
6. FRITZ MA, SPEROFF L. The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fertil Steril.*, 38(s.n):509-529, 1982.
7. GAUER F, MASON-PÉVET P. Pinealectomy and constant illumination increase the density of melatonin bindings sites in the pars tuberalis of rodents. *Brain Research*, 575(s.n):32-38, 1992.
8. LONG JA, EVANS HM. The oestrus cycle in the rat and it's associated phenomena. *Mem. Univ.*, 6(s.n):1-148, 1922.

9. OZAKI Y, WURTMAN RJ, ALONSO R, LYNCH HJ. Melatonin secretion decreases during the proestrous stage in the rat estrous cycle. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 7(s.n):531-534, 1978.
10. PAKOFF H, GOSPODAROWICZ D, LI CH. Purification and properties of ovine follicle stimulating hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* 120(s.n):434-439, 1967.
11. PEDERSEN T, PETERS H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* 17(s.n):555-557, 1968.
12. PRATA LIMA MF, SOARES Jr. JM, REIS JC, SALUM R, BARACT EC. Desenvolvimento de policistose ovariana em ratas pinealectomizadas. *Reprod. Climat.* 10(2):73-75, 1995.
13. REITER RJ. Pineal melatonin cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Society for Endocrinology*, (s.v)(2):151-180, 1991.
14. REITER RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 17(2):273-285, 2003.
15. RIEDER N, SCHMIDT K. *Morphologische Arbeitsmethoden in der Biologie*. Verlagsgesellschaft mbH, Germany, 1987.
16. SANTOS KRP, MENDONÇA JS, TEIXEIRA VW, TEIXEIRA AACT. Influência da Ausência de Luz sobre o Ciclo Estral de Ratas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 70(1):21-23, 2003.
17. SMITH MS, FREEMAN ME, NEILL JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96(s.n):219-226, 1975.
18. TAMARKIN L, BAIRD CJ, ALMEIDA OFX. Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 227(s.n):714-720, 1985.
19. WURTMAN RJ, AXELROD J, CHU EW. Melatonin, a Pineal Substance: Effect on the Rat Ovary. *Science*. 141(s.n):277-278, 1963.

CORRESPONDÊNCIA
Correspondence

Katharine Raquel Pereira dos Santos
Av. Sapé, 1166, Manaira
58.038-382 João Pessoa – Paraíba – Brasil

E-mail
kraquels@yahoo.com.br
rebrasa@ccs.ufpb.br