

ISABELA ROGÉRIO DE PAIVA

Efeito da desnutrição proteica perinatal sobre a população de neurônios sintetizadores das proteínas ligantes de cálcio calbindina, calretinina e parvalbumina no córtex pré-frontal de ratos.

**Araçatuba-SP
2016**

ISABELA ROGÉRIO DE PAIVA

Efeito da desnutrição proteica perinatal sobre a população de neurônios sintetizadores das proteínas ligantes de cálcio calbindina, calretinina e parvalbumina no córtex pré-frontal de ratos.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo

**Araçatuba-SP
2016**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Paulo Ricardo de Paiva e Maria Rogéria da Silva Paiva,**

que sempre enfrentaram todas as dificuldades pensando mais em seus filhos do que neles próprios, cujo amor incondicional pôde fazer da minha felicidade, a felicidade deles. Gostaria de dedicar todas as alegrias e vitórias que graças a vocês eu pude vivenciar durante a minha graduação, pois sei que a luta de vocês foi bem maior que a minha. Só espero um dia poder retribuir com a mesma intensidade todo esse amor e devoção.

Ao meu querido amigo e Prof. **Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo,**

que foi o responsável por esse trabalho ter sido realizado com todo o cuidado e dedicação, e que me deu todas as oportunidades para que hoje eu me tornasse quem eu sou, uma pessoa diferente de seis anos atrás, tanto intelectualmente como emocionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** e ao **Universo** acima de tudo que foi da onde eu pude tirar forças, acreditar em mim e sempre persistir nos meus sonhos. A vida tem sido muito boa comigo, só tenho a agradecer por todas as experiências boas e ruins que contribuíram para a minha evolução. Tenho muito que aprender ainda, essa foi apenas mais uma etapa concluída da minha imensa jornada, que se posso assim dizer será perfeita, obrigada.

Ao **Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo**, mais uma vez eu te agradeço. Espero ter atingido todas as suas expectativas e ter contribuído da melhor forma possível para a realização de todos os projetos com o qual tive a oportunidade de me envolver, o senhor não faz ideia do impacto que teve sobre a minha vida, as mudanças e influências positivas que graças ao senhor pude ter o privilégio de vivenciar. Obrigada pela paciência para me ensinar, pelos conselhos que serviram não apenas para minha vida acadêmica, mas para todos os outros aspectos da minha vida também e obrigada pelo bom humor com uma pequena dose de “ironia” (risos) do qual eu sempre admirei e que fez com que até mesmo as cobranças fossem algo mais leve podendo conciliar divertimento e responsabilidades juntos. Laboratório igual não há, principalmente sem um orientador que além de nos dar a direção correta faz o caminho todo se tornar algo agradável, algo que levaremos para o resto da vida.

A todos os professores e funcionários do **Departamento de Ciências Básicas** obrigada pelos ensinamentos e pela convivência. Obrigada pela ajuda laboratorial principalmente ao **Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia** que me ensinou e contribui com grande valia para minha formação acadêmica e para a realização deste projeto e que acima de tudo proporcionou momentos únicos no ambiente de trabalho, tornando-o sempre agradável. A **Profª Ass. Dr. Alaíde Gonçalvez** agradeço pela oportunidade de trabalhar nesse último ano da minha graduação no projeto “Praticando Ciências”, as experiências vivenciadas com a senhora jamais serão esquecidas, obrigada pelos conselhos e conversas agradáveis ao final de cada atividade.

Minhas melhores amigas **Jéssica**, **Laís** e **Taís** que além de amigas foram as principais contribuidoras para que este projeto fosse realizado, obrigada pela parceria sem vocês nada

disso seria possível. **Job** você foi a primeira a entrar em minha vida logo que cheguei aqui em Araçatuba, a primeira que com certeza podia chamar de amiga, como já te disse antes, foi amizade à primeira vista. Você me encantou com seu jeito sincero e sempre pensando mais nos outros do que em si própria, é muita sorte ter você em minha vida, te amo demais amiga. **Lalá** você me ensinou muito menina, tanto no laboratório como na vida fora dele, foram tantos conselhos entre uma técnica de imuno-histoquímica e outra, tantas risadas e histórias contadas dentro daquela sala. Foi através de você que consegui realizar tudo isso, obrigada por confiar em mim, você faz falta aqui, amo você. **Taís** não tem como esquecer tudo o que você nos ensinou, você chegou por último e conseguiu transformar positivamente vários aspectos do nosso jeito de trabalhar, depois disso pude te conhecer melhor e perceber como você é especial, não mude nunca. Te amo.

Ao **Gestter Willian Lattari Tessarin** que foi o primeiro a me mostrar o funcionamento de um laboratório de pesquisa, sempre me ensinando com paciência e que hoje aceitou o meu convite de ser parte da Banca Avaliadora do meu Trabalho de Conclusão de curso, meus sinceros agradecimentos.

Ao **Júlio Sampar** meu amigo que sempre me apoiou e esteve em todos os momentos mais decisivos da minha vida, e que contribuiu de forma única e singular para o meu crescimento e evolução. Só tenho a agradecer por você abrir meus olhos e me mostrar que na vida há inúmeras possibilidades e só não atinge a vitória quem não enfrenta a jornada e ganha experiência.

Ao **Victor Guerra** e **Letícia Brasil** que contribuíram com dedicação e esforço para a realização desse trabalho. Esse mérito também é de vocês, obrigada.

Aos meus irmãos **Lucas** e **Fernando** que com certeza sentem o mesmo orgulho por mim que eu sinto por vocês meus “manos”. Vocês são o meu exemplo, meus protetores, e que além de irmãos são antes de tudo amigos.

Aos meus familiares da moradia **Rebecca, Guilherme, Diego** e **Rodolfo** obrigada por todo apoio, encontrei em vocês uma família aqui em Araçatuba, onde momentos simples do cotidiano se tornaram muito especiais e únicos. Vou sentir a falta de vocês como sinto a falta de um irmão. Em especial a **Rebecca**, você é a irmã que nunca tive sua presença ao meu lado

é tão natural que quando não está no quarto não é a mesma coisa, com você aprendi tanto que com certeza levarei para sempre na minha vida, nunca conheci alguém tão talentosa, pura, simples, natural e viva tudo isso misturado na medida certa, e que posso crer sem dúvidas que sempre me quis bem, muito obrigada Becca desejo apenas que seja feliz e que a gente possa compartilhar muitas alegrias juntas ainda. **Guilherme** você esteve sempre comigo, sempre me dando conselhos e broncas, e eu agradeço muito por isso. Você abriu meus olhos para diversas questões da vida fazendo com que eu me tornasse uma pessoa melhor. Amo você, obrigada.

Ao **Maurício Bernardi**, você entrou em minha vida de forma rápida e intensa e logo pude ter a certeza que não tinha conhecido antes um ser humano com as qualidades e os defeitos (insignificantes) que te tornariam único da maneira certa, alguém que muitos teriam sorte em ter em suas vidas e eu posso dizer que sou sim muito sortuda! Obrigada por tudo que você já fez por mim sempre me fazendo bem e em especial agradeço muito por ter contribuído para a realização desse projeto.

A todos meus amigos da **Turma XIII** nossa jornada aqui esta chegando ao fim, uma nova fase se iniciará. Obrigada pelos grandes momentos juntos, foram seis anos com vocês.

Enfim gostaria de agradecer imensamente à **FAPESP** (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*), pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica sob o **processo 2012/11307-7**, fazendo assim possível a minha permanência nesta faculdade para que dessa forma pudesse atingir meus objetivos.

***“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu
tamanho original.”***

Albert Einstein.

PAIVA, I. R. **Efeito da desnutrição proteica perinatal sobre a população de neurônios sintetizadores das proteínas ligantes de cálcio calbindina, calretinina e parvalbumina no córtex pré-frontal de ratos.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

A desnutrição proteica perinatal (DPPN) é considerada um grave problema de saúde pública, afetando uma parcela significativa de população mundial. Estudos epidemiológicos indicam que a privação proteica perinatal pode representar fatores de risco para o aparecimento tardio de alguns transtornos mentais e psiquiátricos, fundamentalmente esquizofrenia, condição em que o córtex pré-frontal (CPF) desempenha um papel fundamental. Tendo em vista a correlação entre essas condições neuropsiquiátricas e a DPPN, falta ser determinado se algumas das alterações estruturais encontradas principalmente no CPF de pacientes nessas situações podem ser reproduzidas em modelos experimentais DPPN. Entre estas, foram relatadas alterações no volume cortical e no sistema gabaérgico, incluindo aqui neurônios que expressam também proteínas ligantes de cálcio (PLCs) como a parvalbumina (Pv+), calbindina (Cb+) e calretinina (Cr+). Assim, no presente estudo, usando um modelo do DPPN em ratos, técnicas imuno-histoquímicas e análise estereológica sem viés, quantificamos o volume do CPF, a população neuronal geral evidenciada pela técnica imuno-histoquímica para NeuN, assim como a de neurônios sintetizadores Cb+, Cr+ e Pv+ no CPF de ratos de 21 e 60 dias. Nossa análise estereológica mostrou que DPPN não alterou significativamente o número de neurônios NeuN + no CPF do rato em nenhuma das faixas etárias estudadas. No entanto, observamos uma diminuição significativa no volume no número de neurônios Pv+ em P21, com normalização estatística em P60. Considerando-se que não há diferenças estatísticas no número total de neurônios no CPF de ratos desnutridos e controle, as alterações encontradas no número de neurônios Pv+ parecem indicar uma diminuição na síntese desta proteína nas fases iniciais de desenvolvimento.

Palavras-chave: Córtex pré-frontal. Desnutrição. Esquizofrenia.

PAIVA, R. I. **Effect of perinatal protein malnutrition on the population of neurons synthesizers calcium binding proteins in the prefrontal cortex of rats.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

Perinatal protein malnutrition (PPM) is considered a serious public health concern, affecting a significant portion of the world's population. Epidemiological studies indicate that protein perinatal deprivation may represent risk factors for the late onset of some mental and psychiatric disorders, fundamentally schizophrenia, condition where the prefrontal cortex (PFC) plays a fundamental role. In view of the correlation between these neuropsychiatric conditions and PPM, it remains to be determined if some of the structural changes found mainly in the PFC of patients in these situations may be reproduced in PPM experimental models. Between the structural changes observed in schizophrenic patients, it has been reported alterations in the PFC volume and in the GABAergic system, including here neurons that also express the calcium binding proteins (CBPs) parvalbumin, calbindin and calretinin. Thus, in the present study, using a model PPM in rats, immunohistochemical techniques and unbiased stereological analysis we quantify the PFC volume, the overall neuronal population evidenced by NeuN immunohistochemistry, as well as the calbindin (Cb +), calretinin (Cr +) and parvalbumin (PV +) immunoreactive neurons, in the rat PFC at P21 and P60. Free-floating sections were processed for NeuN and CBPs immunohistochemistry. The total neuron numbers was estimated using the optical fractionator, with the region of interest (ROI) including all layers and areas of the PFC. Our stereological analysis showed that PPM did not significantly alter the number of NeuN+ neurons in the rat mPFC in any of the ages studied. However, we observed a significant decrease in the PFC volume as well as in the number of Pv+ neurons in the PFC at P21. Considering that there are no differences in the total number of neurons in the mPFC of control and malnourished rats, the changes found in the number of Pv+ neurons indicate a decrease in the synthesis of this protein in the early stages of development.

Keywords: Pre frontal cortex . Malnutrition. Schizophrenia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Delimitação do CPF recentemente preconizada por PEREZ-CRUZ et al. (2007), que limitam o CPF do rato às áreas PL, IL, e ACx	24
Figura 2- Microfotografias de cortes de encéfalo de ratos normais de 60 dias de idade, com técnica imuno-histoquímica para a evidênciação de NeuN	31
Figura 3- Microfotografias de cortes de encéfalo de ratos normais de 60 dias de idade, com técnica imuno-histoquímica para a evidênciação de calbindina (Cb)	33
Figura 4- Microfotografias de cortes de encéfalo de ratos normais de 60 dias de idade, com técnica imuno-histoquímica para a evidênciação de calretinina (Cr)	35
Figura 5- Microfotografias de corte de encéfalo de ratos normais de 60 dias de idade, com técnica imuno-histoquímica para a evidênciação de parvalbumina (Pv)	37

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela e gráfico 1. Peso corporal(em gramas) de ratos nutridos (N) e desnutridos (D)	27
Tabela e gráfico 2. Peso encefálico (em gramas) de ratos nutridos (N) e desnutridos (D)	28
Tabela e gráfico 3. Volume do CPF (em mm ³) de ratos nutridos (N) e desnutridos (D)	29
Tabela e gráfico 4. Volume encefálico parcial (VEP, em mm ³) de ratos nutridos (N) e desnutridos (D)	30
Tabela e gráfico 5. Número de neurônios NeuN+ em animais nutridos (N) e desnutridos (D) aos 21 e 60 dias	32
Tabela e gráfico 6. Número de neurônios Cb+ em animais nutridos (N) e desnutridos (D) aos 21 e 60 dias	34
Tabela e gráfico 7. Número de neurônios Cr+ em animais nutridos (N) e desnutridos (D) aos 21 e 60 dias	36
Tabela e gráfico 8. Número de neurônios Pv+ em animais nutridos (N) e desnutridos (D) aos 21 e 60 dias	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAd = anterior cingulate área, dorsal part

ACx = Anterior Cingular córtex

AIN = American Institute of Nutrition

Cb = calbindina

Cg1 = cingulate cortex, area 1

Cg2 = cingulate cortex, area 2

CPf = Córtex pré-frontal

Cr = calretinina

D = desnutridos

DMSO = DIMETIL-SULFATO

DPPN = Desnutrição proteica perinatal

FAO = Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas

IL = infralimbic córtex

MO = medial orbital córtex

Mos = secondary motor área.

N = nutridos

PLCs = proteínas ligantes de cálcio

PrL = prelimbic córtex

Pv = parvalbumina

ROI = Region of Interest (Região de interesse)

SNC = Sistema Nervoso Central TDAH = Transtorno do déficit de atenção/hiperatividade

TBS = Tris Base (Amresco, EUA) + NaCl

TBS-TX = TBS + 0,5% de Triton X-100, Amresco, EUA

VCPF = volume do Córtex pré-frontal

VEP = volume encefálico parcial

SUMÁRIO

Introdução	14
Objetivos	19
Metodologia	20
Resultados	27
Discussão	39
Conclusão	45
Referências	46

1 Introdução

A desnutrição é um dos principais fatores não genéticos que afetam o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Estudos clínicos e experimentais indicam que a desnutrição induz alterações estruturais e bioquímicas no cérebro, causando disfunção cognitiva (ALAMY; BENGELLOUN, 2010). Isso coloca a fome, que ainda afeta um grande número de crianças em todo o mundo, entre os problemas globais mais críticos na área de saúde pública. De fato, de acordo com o último relatório da Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO, 2014), apesar dos progressos realizados nos últimos anos 805 milhões de pessoas estavam cronicamente desnutridas entre 2012 e 2014. O relatório indica ainda que a meta estabelecida pelo World Food Summit de 1996, de reduzir o número de pessoas subnutridas pela metade até 2015, não será alcançado.

Apesar de décadas de investigação ainda não entendemos plenamente o impacto real da desnutrição no desenvolvimento do cérebro, no comportamento e nos processos cognitivos. Além disso, a eficácia dos tratamentos paliativos que visam melhorar os parâmetros estruturais e cognitivos que são alterados pela insuficiência alimentar, requer uma investigação mais aprofundada.

Embora modelos experimentais de desnutrição são insuficientes para avaliar plenamente o impacto da desnutrição em seres humanos, eles permitem a análise de possíveis mudanças estruturais e comportamentais associadas com este problema. (LAUS et al., 2011),

Manipulações alimentares experimentais podem ser realizadas ao longo de todo o período de gestação ou durante parte dele, e podem ser estendidas para o período de lactação ou mesmo posteriormente.

Outra vantagem dos modelos experimentais é que o cérebro de animais desnutridos pode ser examinado em fases específicas do desenvolvimento. Isto é importante já que vários eventos do desenvolvimento do SNC tais como a proliferação celular, migração, diferenciação, sinaptogênese, e mielinização, ocorrem durante períodos críticos específicos e assim estes podem ser estudados individualmente (RICE et al., 2000).

Entre as manipulações alimentares, a desnutrição proteica perinatal (DPPN), em que a deficiência proteica afeta a totalidade ou parte da gravidez e se estende após o nascimento, tem sido amplamente utilizada, em parte porque reproduz as deficiências nutricionais comumente observadas em humanos (ALAMY; BENGELLOUN, 2010). Estudos utilizando modelos DPPN indicam que a desnutrição proteica está associada a alterações estruturais e bioquímicas em certas estruturas cerebrais, com ênfase no hipocampo. Essas alterações incluem a diminuição do número de neurônios no giro dentado e nas áreas CA3 e CA1, alterações na diferenciação celular, e diminuição da complexidade dendrítica e sináptica. Além disso, foram observadas alterações em vários sistemas de neurotransmissão (MORGANE et al., 2002). Estudos comportamentais revelaram que essas mudanças bioquímicas e estruturais também foram associadas com déficits cognitivos em animais desnutridos (LUKOYANOV et al., 2000).

De acordo com o conhecimento atual, a patologia neural primária em casos de desnutrição parece envolver alterações em tipos específicos de interneurônios inibitórios gabaérgicos, pelo menos no que diz respeito às alterações observadas no hipocampo (MORGANE et al., 2002).

Além desses dados experimentais, estudos retrospectivos em populações humanas apontam uma correlação entre a desnutrição perinatal e um aumento do risco para o aparecimento tardio de doenças psiquiátricas como a depressão (SUSSER et al., 1996; NEUGEBAUER et al., 1999) e a esquizofrenia (ST CLAIR et al., 2005). Curiosamente, algumas das modificações estruturais descritas em pacientes esquizofrênicos tais como diminuição do volume cortical e o aumento da densidade neuronal (no córtex pré-frontal (CPF) e temporal), assim como alterações no sistema gabaérgico, são semelhantes aos descritos em modelos experimentais de desnutrição, o que pode indicar um fenômeno semelhante na desnutrição e esquizofrenia.

Os neurônios gabaérgicos afetados incluem subgrupos que expressam também proteínas ligantes de cálcio (PLCs) como a parvalbumina (Pv), calbindina (Cb) e calretinina (Cr). Coletivamente, as PLCs correspondem a mais de 90% de todos os neurônios gabaérgicos do córtex cerebral, motivo pelo qual sua análise serve para avaliar eventuais alterações da transmissão gabaérgica nesta região (EYLES et al., 2002).

As diversas PLCs são expressas fundamentalmente em tipos específicos de interneurônios corticais. Pv é observada em neurônios tipo candelabro e neurônios em cesto; Cb em neurônios *double-bouquet*, e Cr em neurônios bipolares e *bitufted* (LUND; LEWIS, 1993; CONDE et al., 1994; LEWIS, 1998). Cada tipo neuronal apresenta uma arborização dendrítica que permite contatos sinápticos específicos com os neurônios de projeção cortical. Neurônios em candelabro (PV+), por exemplo, formam estruturas conhecidas como cartuchos sinápticos, os quais envolvem o segmento inicial de axônios dos neurônios piramidais. Conseqüentemente, esses neurônios são capazes de exercer uma grande

influência sobre as principais células de projeção do córtex já que se estima que cada um deles pode fazer sinapse com até 200 neurônios piramidais (LEWIS, 2011).

Alguns estudos indicam alterações na contagem de neurônios que expressam PLCs em indivíduos esquizofrênicos, mas não existe consenso (DAVISS; LEWIS, 1995; BEASLEY; REYNOLDS, 1997; KALUS et al., 1997; WOO et al., 1997; DANOS et al., 1998; WOO et al., 1998; IRITANI et al., 1999; REYNOLDS; BEASLEY, 2001). Geralmente esses estudos não utilizam técnicas estereológicas, mas apenas contagens bidimensionais de perfis neuronais. Raramente é incluída uma contagem do número total de neurônios na região analisada, de forma que fica difícil determinar se a diminuição ou aumento no número de determinada população é real ou reflete uma alteração da população geral, ou mesmo alterações de densidade celular provocadas artificialmente pela contração dos tecidos durante o preparo histológico.

Embora a correlação entre a desnutrição e esquizofrenia tenha sido revelada, não se sabe como a DPPN poderia afetar o desenvolvimento do CPF, uma região que é funcionalmente alterada nesta doença (HARRISON et al., 1999). Além disso, se o desenvolvimento do CPF é estruturalmente alterado pela desnutrição proteica, não sabemos até que ponto estas alterações são semelhantes às observados no CPF de pacientes com esquizofrenia.

Para responder a algumas destas perguntas, usamos métodos estereológicos sem viés e técnicas de evidenciação imuno-histoquímica para quantificar o impacto da DPPN experimental severa sobre o volume do CPF e sobre as populações neuronais sintetizadoras das proteínas ligantes de cálcio parvalbumina, calbindina e calretinina, assim como o

número total de neurônios mediante a evidênciação imuno-histoquímica da proteína neuronal nuclear (NeuN).

2 Objetivos

Mediante a utilização de métodos estereológicos, quantificar em regiões específicas do CPfm de ratos controle e submetidos a DPPN :

a) A população neuronal geral mediante a contagem de neurônios evidenciados pela técnica imuno-histoquímica para NeuN (proteína nuclear específica de neurônios).

b) As populações neuronais sintetizadoras das proteínas ligantes do cálcio parvalbumina, calbindina e calretinina evidenciadas por técnicas imuno-histoquímicas para as três proteínas.

c) O volume do CPF (VCPF) e o volume encefálico parcial (VEP, volume encefálico parcial, que representa o volume da região encefálica correspondente ao corte onde se localiza o CPF analisado) quantificado utilizando o método estereológico de Cavalieri.

Uma vez estabelecida a correlação entre DPPN e as condições neuropsiquiátricas já descritas na Introdução, este estudo visa esclarecer se as alterações estruturais encontradas no córtex pré-frontal de pacientes com essas situações clínicas podem ser reproduzidas em modelos experimentais de desnutrição protéica.

3 Metodologia

3.1. Modelo de desnutrição proteica

Para a formação das ninhadas neste estudo foram utilizados ratos jovens, machos e fêmeas, da linhagem wistar (*Rattus norvegicus*), com peso entre 280 e 320 gramas, fornecidos pelo biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciência Biológicas da Universidade de São Paulo. O modelo de desnutrição proteica adotado seguiu o seguinte protocolo:

Durante o acasalamento, um macho foi mantido com duas fêmeas durante um período de 7 a 10 dias, onde foi oferecida dieta “*ad libitum*” com a ração para roedores AIN-93G, que segue as especificações do protocolo preconizado pelo “American Institute of Nutrition” (REEVES et al., 1993). A ração foi preparada em laboratório especializado.

Para alguns trios (um macho / duas fêmeas) foi oferecida ração denominada proteica (AIN 93G, Rhooster) contendo 20% de caseína e para outros, a ração hipoproteica, com apenas 5%. Após o acasalamento, as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais e de acordo com as rações oferecidas formaram os grupos de animais nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) e foram mantidas com as respectivas dietas durante a gestação e a amamentação, permanecendo seis filhotes machos por ninhada, até que estes atingiram 21 dias de vida, época determinada para o desmame.

Após esse período, os filhotes **N** e **D** foram mantidos com suas respectivas dietas até que completem 60 dias de vida, constituindo assim os grupos **N** e **D**. Grupos de animais (seis **N** e seis **D**) foram sacrificados com 21 e 60 dias (fases pré-púbere e púbere respectivamente, de acordo com VIAU et al., 2005).

Finalizados os períodos experimentais, os animais foram pesados, anestesiados profundamente e perfundidos com soluções de fixação histológica de acordo com o seguinte protocolo:

Após conseguirmos um plano de anestesia profunda (100 mg/mL cetamina - Dopalen e 20 mg/mL de xilasina - Rompum), os animais foram perfundidos por via intracardíaca, mediante a utilização de bomba perfusora peristáltica, com a seguinte sequência de soluções:

a) Soro salino a temperatura ambiente e em uma quantidade suficiente para permitir um retorno vascular quase transparente (0,5ml/g de peso corporal aproximadamente).

b) Solução fixadora composta de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 a 4° (1ml/g de peso corporal aproximadamente).

3.2. Remoção dos encéfalos, pós-fixação, crioproteção, e técnicas

imuno-histoquímicas

Finalizada a perfusão, os encéfalos foram cuidadosamente removidos, pesados, e mantidos por duas horas na mesma solução fixadora a 4°C. Para evitar a extrema contração que se observa quando é utilizada solução crioprotetora elaborada à base de sacarose, utilizamos uma solução crioprotetora composta de glicerol 10% e DMSO 2% dissolvidos em tampão fosfato 0,1M; pH 7,3; a 4°C, por três dias, e mais quatro dias em solução de glicerol 20% e DMSO 2% dissolvidos no mesmo tampão, a 4°C, conforme descrição de Rosene (1986).

Após a crioproteção, os encéfalos foram congelados com gelo seco e cortados em criostato, com espessura de corte de 50 µm.

Os cortes foram recolhidos em recipientes (Placa de cultura) contendo tampão fosfato, e separadas seis séries -resultando em distâncias de 300µm entre cortes de uma mesma série.

Para a realização das técnicas imuno-histoquímicas os cortes foram lavados em TBS 0,05M (Tris Base (Amresco, EUA) + NaCl) (3 x 10 minutos) e depois incubados durante 30 minutos em H₂O₂ 0,3% diluída em TBS-TX 0,05 M (TBS + 0,5% de Triton X-100, Amresco, EUA), pH 7,6.

Em seguida os cortes foram lavados novamente em TBS-TX (3 x 10 minutos) e subsequentemente incubados com soro fetal bovino a 3% (Vector Laboratories, EUA) em TBS-TX, durante 1 hora. Após três lavagens em TBS-TX, os cortes foram incubados durante 48 horas com o anticorpo primário correspondente (monoclonal anti-NeuN (rato), Millipore, A60 clone, 1:2000; monoclonal anti Calretinin 6B3 (camundongo), 1:5000, Swant; monoclonal anti Calbindin D-28k (camundongo), 1:5000, Swant; monoclonal anti parvalbumin PV 235 (camundongo), 1:5000, Swant) diluído em TBS-TX e sob suave agitação a 4 ° C.

Os cortes foram posteriormente lavados com TBS-TX, durante 30 minutos e incubados durante 2 horas com os respectivos anticorpos secundários biotinilados (1:200, Vector Laboratories). Posteriormente, após nova série de lavagens (3 x 10 minutos com TBS-TX), os cortes foram incubados com complexo avidina-biotina-peroxidase (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories; diluição 1: 100 em TBS-TX) à temperatura ambiente durante 90 minutos. Os locais antigênicos foram visualizadas utilizando como cromógenos tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, EUA) 0,02-0,05% e sulfato de amônio níquel a 0,1% ou VIP (Vector Laboratories). Os cortes foram posteriormente montados em lâminas gelatinizadas, desidratados em série crescente de álcoois, desengordurados com xilol, e cobertos com lamínula utilizando DPX como meio de montagem.

Todas as baterias de imuno-histoquímicas para uma mesma técnica (incluindo os seis animais controle e os seis desnutridos nos grupos de 21 e 60) foram realizadas simultaneamente, de forma que todos os cortes foram expostos às mesmas soluções e tempos de incubação e revelação, o que evita que os resultados sejam influenciados por eventuais variações de temperatura, concentração, revelação, etc. Em virtude disto, como

os animais dos grupos de 21 e 60 dias não foram processados simultaneamente, optamos por não realizar comparações longitudinais.

3.3. Delimitação do córtex pré-frontal

Uma das condições necessárias para uma correta análise estereológica é que a região a ser analisada seja bem delimitada. Além dos aspectos matemáticos envolvidos, isto é fundamental para que os experimentos sejam reproduzíveis por outros pesquisadores.

Infelizmente, em relação ao CPF do rato (e de roedores em geral) os limites entre as áreas dessa região não são bem definidos. Ao contrário do que observamos em primatas onde as transições entre áreas granulares, disgranulares e agranulares podem ser definidas por critérios cito, mielo ou quimioarquitetônicos (CRUZ-RIZZOLO et al., 2011), estas técnicas não parecem ser satisfatórias para delimitar com precisão áreas corticais no CPF do rato. Prova disso são as diversas nomenclaturas e limites propostos nos principais atlas.

Provavelmente o único consenso é que uma região homóloga ao CPF observado em primatas pode ser localizada apenas na fase medial do lobo frontal. No atlas de Paxinos e Watson (2006), esta região inclui as áreas MO (medial orbital córtex), PrL (prelimbic cortex), IL (infralimbic cortex) e Cg1 (cingulate cortex, area 1). PrL e IL não ultrapassam no sentido posterior o joelho do corpo caloso, já Cg1 e a mais ventral Cg2 (cingulate cortex, area 2) se estendem em direção posterior, mas na realidade fazem parte do giro do cíngulo, e não do CPF. Já no atlas de Swanson (1992) a parede medial do lobo frontal é ocupada pelas áreas ILA, PL, ACA_d (anterior cingulate área, dorsal part) e MOs (secondary motor área).

Além das diferentes nomenclaturas (apenas IL - ILA e PrL - PL apresentam nomenclatura similar), os limites entre as áreas diferem (UYLINGS et al., 2003). Já outros autores (KRETTEK;

PRICE, 1977; PEREZ-CRUZ et al., 2007) mantem as áreas PL e IL e acrescentam dorsalmente a área ACx (Anterior Cingular córtex, denominada Fr2 por Zilles (1985)).

Isto posto, resulta difícil delimitar por critérios puramente arquitetônicos a região que será utilizada para a quantificação estereológica já que não existe consenso em relação aos limites. Isto se torna ainda mais difícil em algumas técnicas imuno-histoquímicas onde apenas uma população neuronal específica é evidenciada.

A opção mais viável foi utilizar além desses critérios citoarquitetônicos, critérios de delimitação “geométricos”, facilmente reproduzíveis entre os diversos autores, mas que ao mesmo tempo incorporassem as regiões de interesse. Neste sentido, nossa região de interesse (ROI) passou a ocupar quase que completamente a face medial do lobo frontal (Figura 1), estendendo-se posteriormente até o início da decussação do corpo caloso. Esta ROI incorpora completamente as áreas IL e PL (sobre as quais existe consenso como pertencentes ao CPF), assim como as extensões frontais das áreas cingulares nas suas mais diversas denominações. Esta delimitação é praticamente a mesma utilizada recentemente por PEREZ-CRUZ et al. (2007), que limitam o CPF do rato às áreas PL, IL, e ACx.

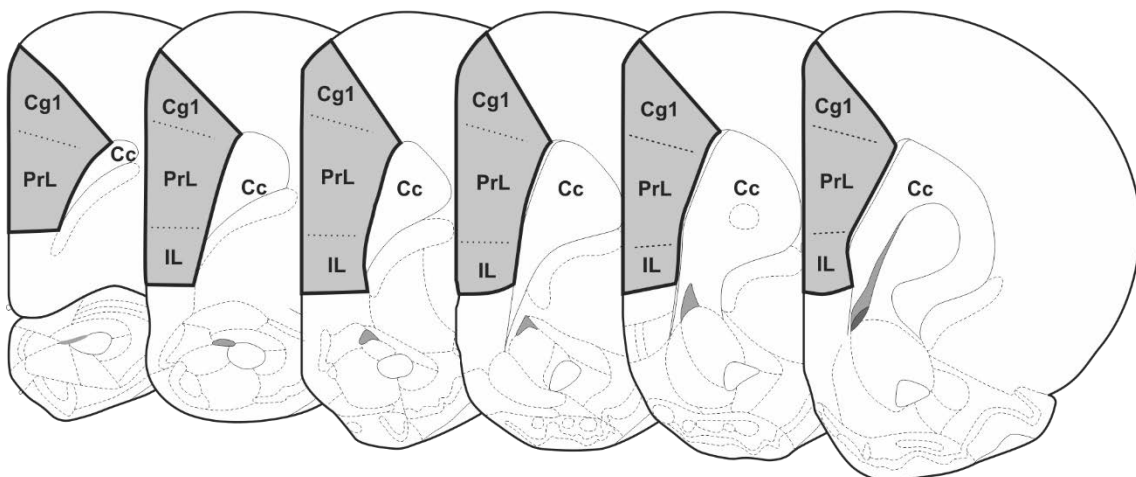


Fig. 1. A área sombreada ilustra a delimitação aproximada da ROI (Region of Interest). Ela coincide superiormente com os ângulos dorsomediais, tanto na superfície cerebral como no limite entre a camada VI e a substância branca. Inferiormente se estende até o (alo)córtex peduncular dorsal, de fácil identificação.

3.4. Análise microscópica e técnicas de contagem.

Lâminas contendo os cortes histológicos reagidos de acordo com as diversas técnicas foram analisadas em um microscópio Zeiss Imager Z2 equipado com platina motorizada e câmera digital conectada a um computador executando o programa Stereo Investigator (Microbrightfield, EUA). Para a quantificação estereológica foi utilizado o método do fracionador óptico (WEST et al., 1991). Foram utilizados todos os cortes desde o primeiro aparecimento até a decussação do corpo caloso, gerando entre 6 a 8 cortes com intervalos de 6 para cada técnica e cada animal.

Dependendo da técnica, as caixas de contagem variaram entre 50 a 150 μm^2 , e seu número entre 15 ou 20 em cada ROI, de forma a incluir um mínimo de 300 células contadas em cada animal.

O dissector óptico foi ajustado de acordo com a espessura real do corte, que podia variar dependendo da contração produzida por cada técnica. Foi adotado um índice de erro (Gundersen) $< 0,07$.

Para determinar a estimativa do número de células dentro da ROI (N) o programa utiliza a fórmula:

$$N = (\Sigma Q) (1/ssf) (1/asf) (1/tsf)$$

Onde:

N = número total de células

ΣQ = número de células efetivamente contadas

ssf = "section sampling fraction" (número de secções contadas/total de secções)

asf = "area sampling fraction" (área bloco de contagem/área da grade)

tsf = "tissue sampling fraction" (altura bloco/média da espessura da secção)

Já o volume do CPF (VCPF) e o volume encefálico parcial (VEP, volume encefálico parcial, que representa o volume da região encefálica correspondente ao corte onde se localiza o CPF analisado) foi quantificado utilizando o método estereológico de Cavalieri, usando também o programa Stereo Investigator, de acordo com a fórmula:

$$\hat{V} = A_p m' \bar{t} \left(\sum_{i=1}^n P_i \right)$$

Onde

V : Volume estimado

A_p : Área associada ao ponto da grade

m' : Intervalo entre cortes

t : Espessura média do corte

P_i : Pontos contados por grade

Para esta análise foram utilizados os mesmos cortes e os contornos do CPF (VCPF) e o contorno externo do corte (VEP).

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças entre os animais controle e desnutridos em cada período experimental (P21 e P60) foram analisadas pelo teste t de Student não pareado. Para todos os testes estatísticos, $p < 0,05$ indica uma diferença significativa entre os grupos N e D.

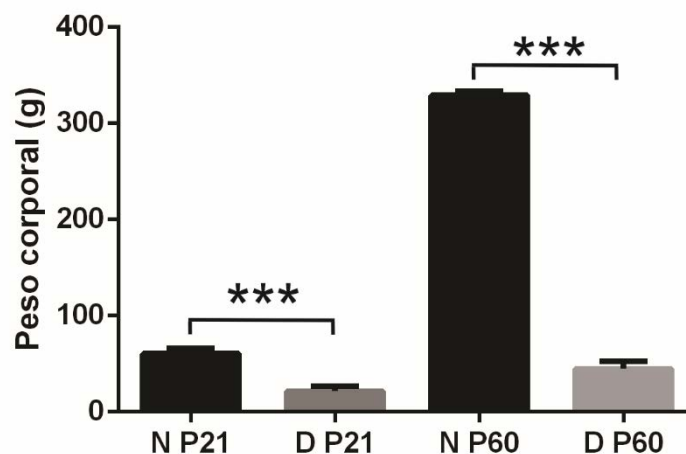
4 Resultados

4.1. Dados ponderais e volumétricos

Conforme previsto, a desnutrição proteica produziu alterações significativas no peso corporal e no peso do encéfalo tanto nos animais de 21 como de 60 dias. Nos animais desnutridos foi também observada uma diminuição significativa no volume do CPF e encefálico.

Tabela e gráfico 1. Peso corporal (em gramas) de ratos nutridos (N) e desnutridos (D).

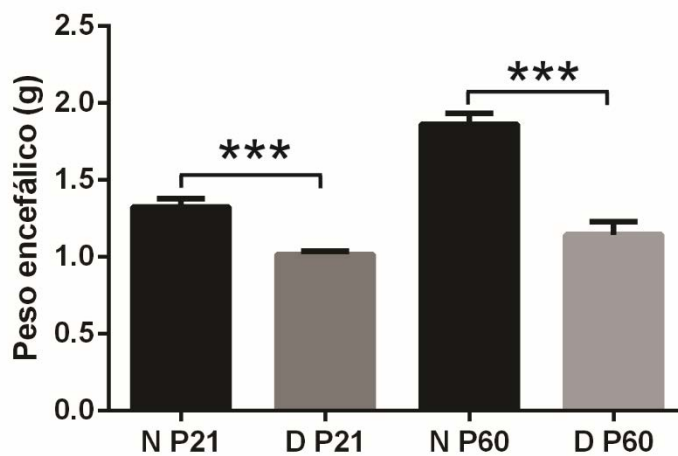
	N P21	D P21	N P60	D P60
Animal 1	49,70	26,56	332,90	35,10
Animal 2	60,13	24,72	334,40	40,20
Animal 3	67,55	27,52	328,04	58,40
Animal 4	64,01	17,84	322,90	45,19
Animal 5	60,60	16,82	331,18	45,77
Animal 6	60,07	15,63	326,02	44,80
Média ± Desvio padrão	60 ± 2,4	22 ± 2,2	329,2 ± 4,38	44,91 ± 7,76



Representação gráfica dos dados relativos ao peso corporal dos animais nutridos e desnutridos, com 21 e 60 dias de idade. *** = $p < 0,0001$ (diferenças extremamente significativas).

Tabela e gráfico 2. Peso encefálico (em gramas) de ratos nutridos (N) e desnutridos (D).

	N P21	D P21	N P60	D P60
Animal 1	1,27	1,02	1,80	1,15
Animal 2	1,28	1,03	1,99	1,07
Animal 3	1,30	1,03	1,80	1,20
Animal 4	1,41	1,03	1,89	1,24
Animal 5	1,35	1,02	1,87	1,19
Animal 6	1,35	0,98	1,83	1,02
Média ± Desvio padrão	1,3 ± 0,022	1,0 ± 0,0079	1,86 ± 0,07	1,14 ± 0,08

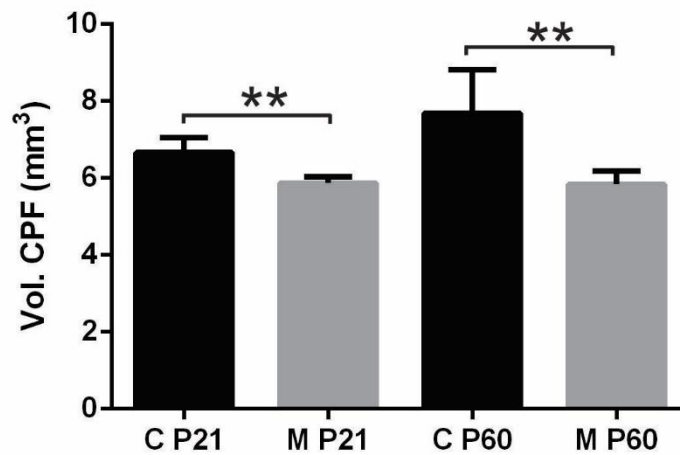


Representação gráfica dos dados relativos ao peso do encéfalo dos animais nutridos e desnutridos com 21 e 60 dias de idade. *** = $p < 0,0001$ (diferenças extremamente significativas).

4.2 Volumes corticais

Tabela e gráfico 3. Volume do CPF (em mm³) de ratos nutridos (N) e desnutridos (D).

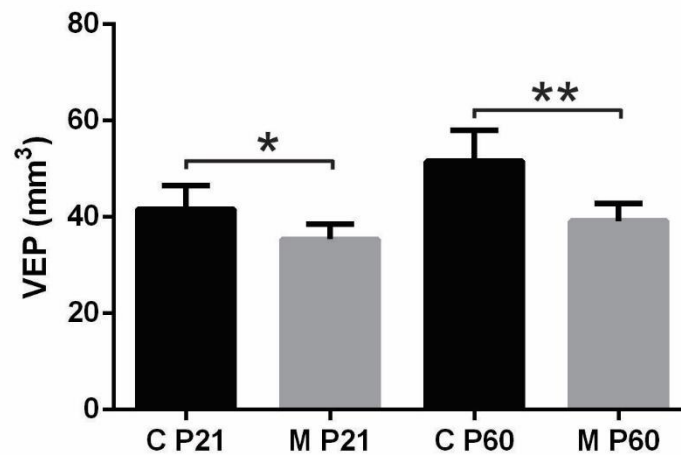
	N P21	D P21	N P60	D P60
Animal 1	6,55	6,02	7,03	5,48
Animal 2	6,88	5,69	7,63	6,24
Animal 3	6,47	5,94	7,40	5,80
Animal 4	6,23	5,65	9,92	5,40
Animal 5	7,20	6,06	6,92	6,17
Animal 6		5,87	7,21	5,95
Média ± Desvio padrão	6,666 ± 0,3785	5,872 ± 0,1699	7,685 ± 1,124	5,840 ± 0,3481



Representação gráfica dos dados relativos ao volume do CPF dos animais nutridos e desnutridos com 21 e 60 dias de idade. ** = p < 0,001 (diferenças muito significativas).

Tabela e gráfico 4. Volume encefálico parcial (VEP, em mm^3) de ratos nutridos (N) e desnutridos (D).

	N P21	D P21	N P60	D P60
Animal 1	35,66	31,84	52,67	41,17
Animal 2	38,92	32,55	58,40	36,86
Animal 3	46,43	33,83	56,05	43,10
Animal 4	40,14	39,17	49,20	40,82
Animal 5	46,90	36,46	52,90	33,01
Animal 6		38,44	40,10	40,09
Média \pm Desvio padrão	41,61 \pm 4,899	35,38 \pm 3,093	51,55 \pm 6,432	39,18 \pm 3,641



Representação gráfica dos dados relativos ao volume encefálico parcial dos animais nutridos e desnutridos com 21 e 60 dias de idade. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$.

NeuN

Aspectos morfológicos

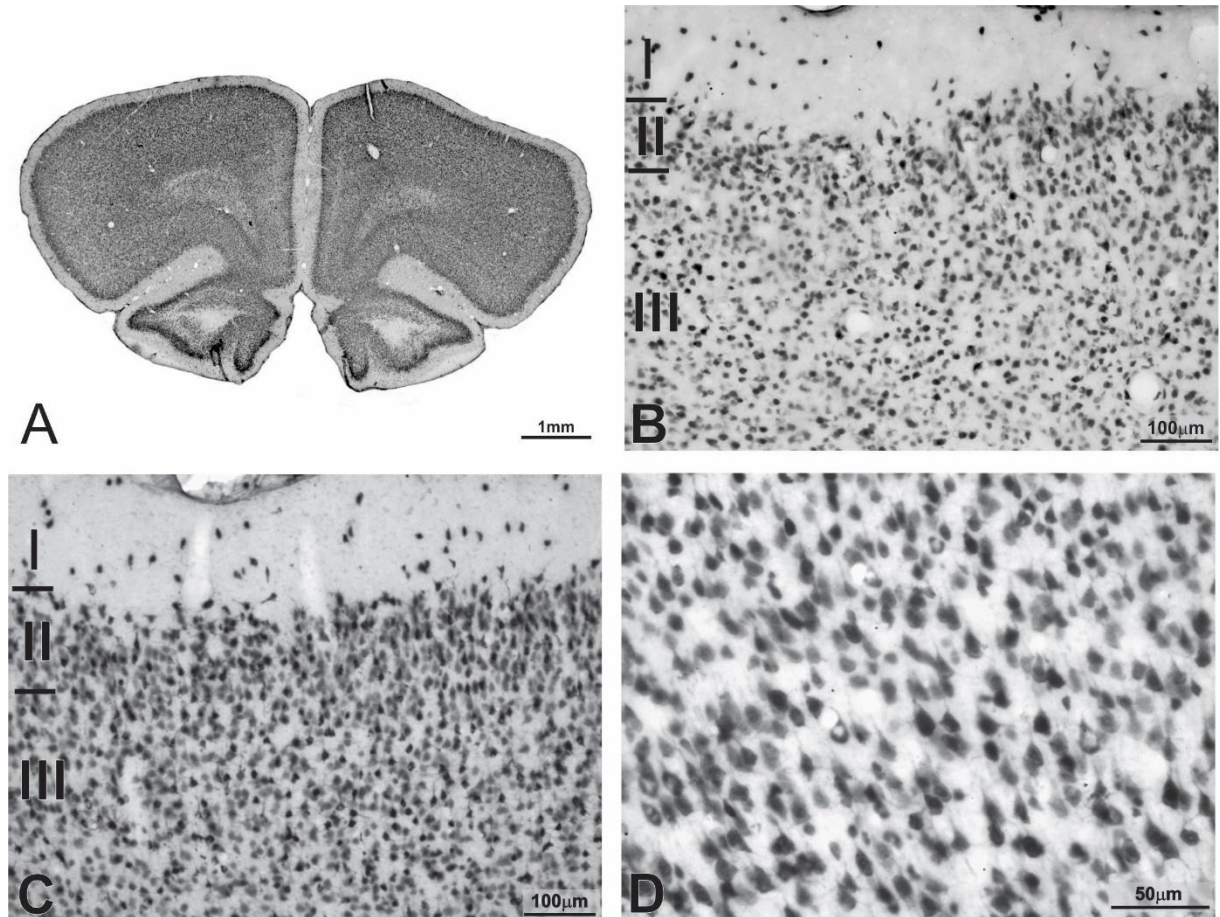


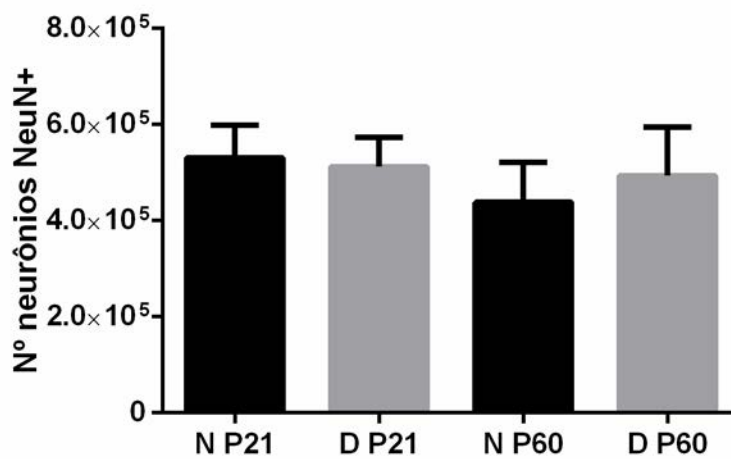
Fig. 2. Fotomicrografias de cortes de encéfalo de ratos normais de 60 dias de idade, com técnica imunohistoquímica para a evidência de NeuN. Em **A** corte em pequeno aumento ao nível do córtex pré-frontal. Observar que com esta técnica os núcleos neuronais (mas não da glia) são marcados. Em **B** e **C** estão indicadas as camadas corticais I a III (coordenada AP Bregma (aprox.) +4,0). Em **D**, imagem em maior aumento.

Aspectos quantitativos

Nossos resultados mostram que a desnutrição proteica não alterou significativamente o número de neurônios no CPF, conforme pode ser observado nos dados estatísticos abaixo apresentados.

Tabela e gráfico 5. Número de neurônios NeuN+ em animais nutridos (N) e desnutridos (D) aos 21 e 60 dias.

	N P21	D P21	N P60	D P60
Animal 1	591775	584853	407205	418127
Animal 2	502351	549715	454863	369912
Animal 3	504606	428761	406606	424652
Animal 4	608842	483655	559292	602641
Animal 5	446752	202861	486953	561399
Animal 6	508612	515863	315714	584532
Média±Desvio padrão	527200±25020	461000±25390	438439±82800	493544±100503



Representação gráfica dos dados relativos ao número de neurônios NeuN+ nos animais nos grupos Nutrido (N) e Desnutrido (D) com 21 e 60 dias (diferenças não significativas entre os grupos).

Calbindina

Aspectos morfológicos

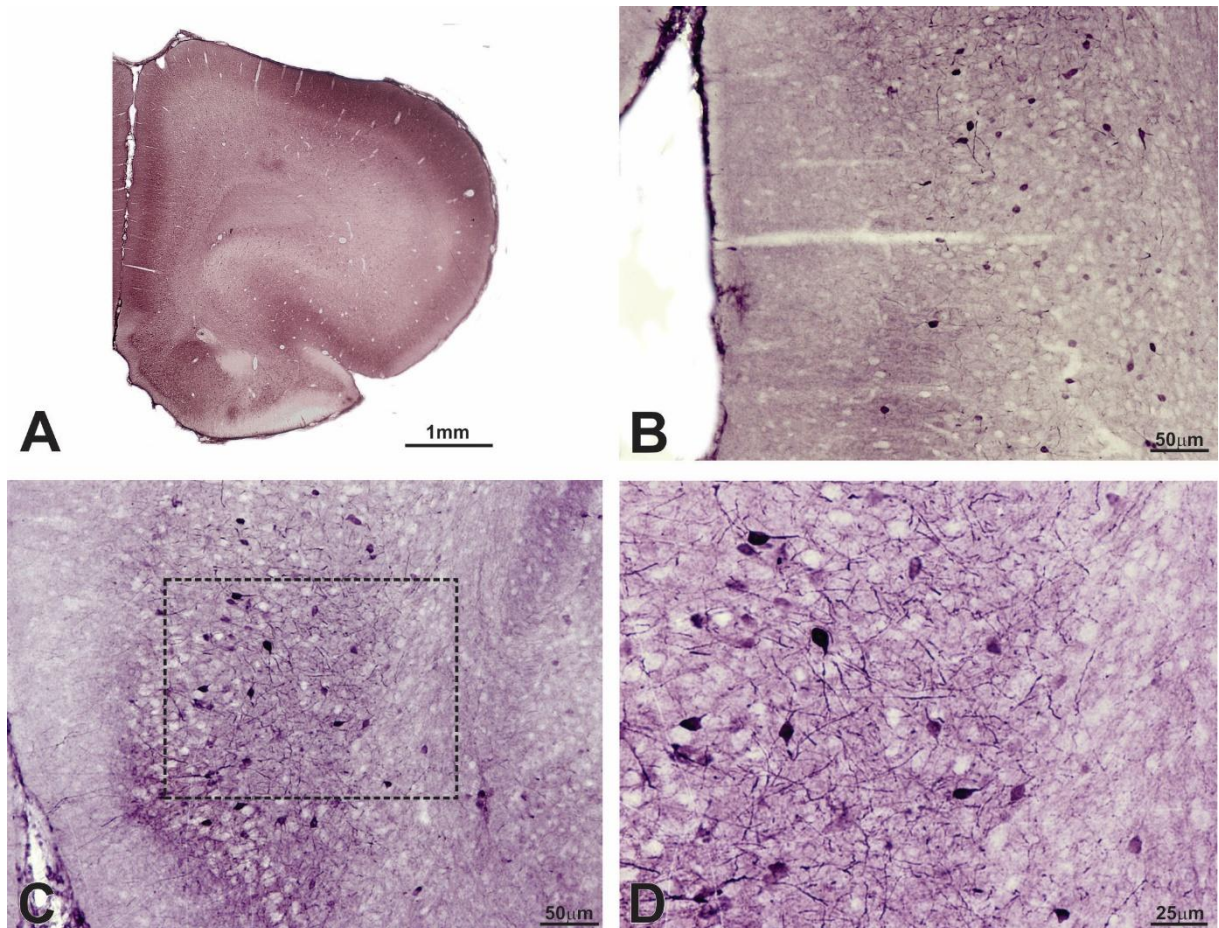


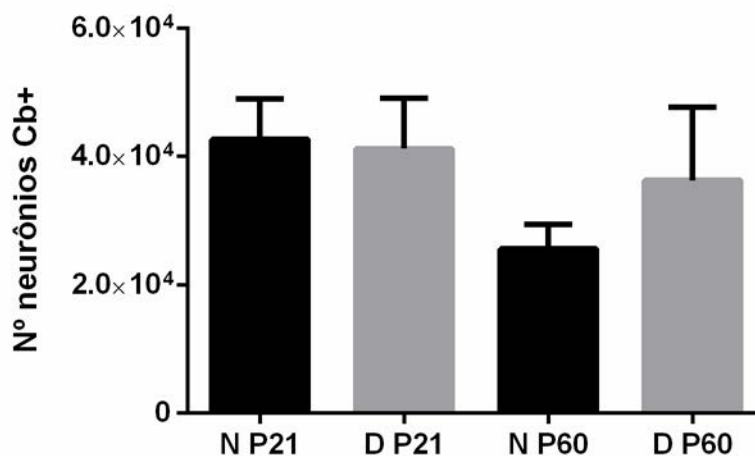
Fig. 3. Fotomicrografias de cortes de encéfalo de ratos normais de 60 dias de idade, com técnica imunohistoquímica para a evidência de calbindina (Cb). Em **A** corte em pequeno aumento mostrando o hemiencéfalo esquerdo, ao nível do córtex pré-frontal. Em **B**, **C** e **D** imagens em maior aumento onde podem ser observados corpos celulares, fibras e neuropilo. **D** corresponde à área destacada (retângulo) em **C**. (coordenada AP Bregma (aprox.) +3,7)

Aspectos quantitativos

Nossos resultados mostram que a desnutrição proteica não alterou significativamente o número de neurônios imunorreativos para calbindina, tanto no grupo de 21 como no de 60 dias.

Tabela e gráfico 6. Número de neurônios Cb+ em animais nutridos (N) e desnutridos (D) aos 21 e 60 dias.

	N P21	D P21	N P60	D P60
Animal 1	40993,	35332,	26986,	16490,
Animal 2	47172,	42034,	20850,	33704,
Animal 3	38077,	42648,	21681,	32860,
Animal 4	46533,	29620,	30600,	46214,
Animal 5	50093,	52258,	26824,	47187,
Animal 6	33316,	45357,	27086,	41110,
Média ± Desvio padrão	42700±2593	41210± 3219	25671±3702	36261±11410



Representação gráfica dos dados relativos ao número de neurônios Cb+ nos animais nos grupos Nutrido (N) e Desnutrido (D) com 21 e 60 dias (diferenças não significativas entre os grupos).

Calretinina

Aspectos morfológicos

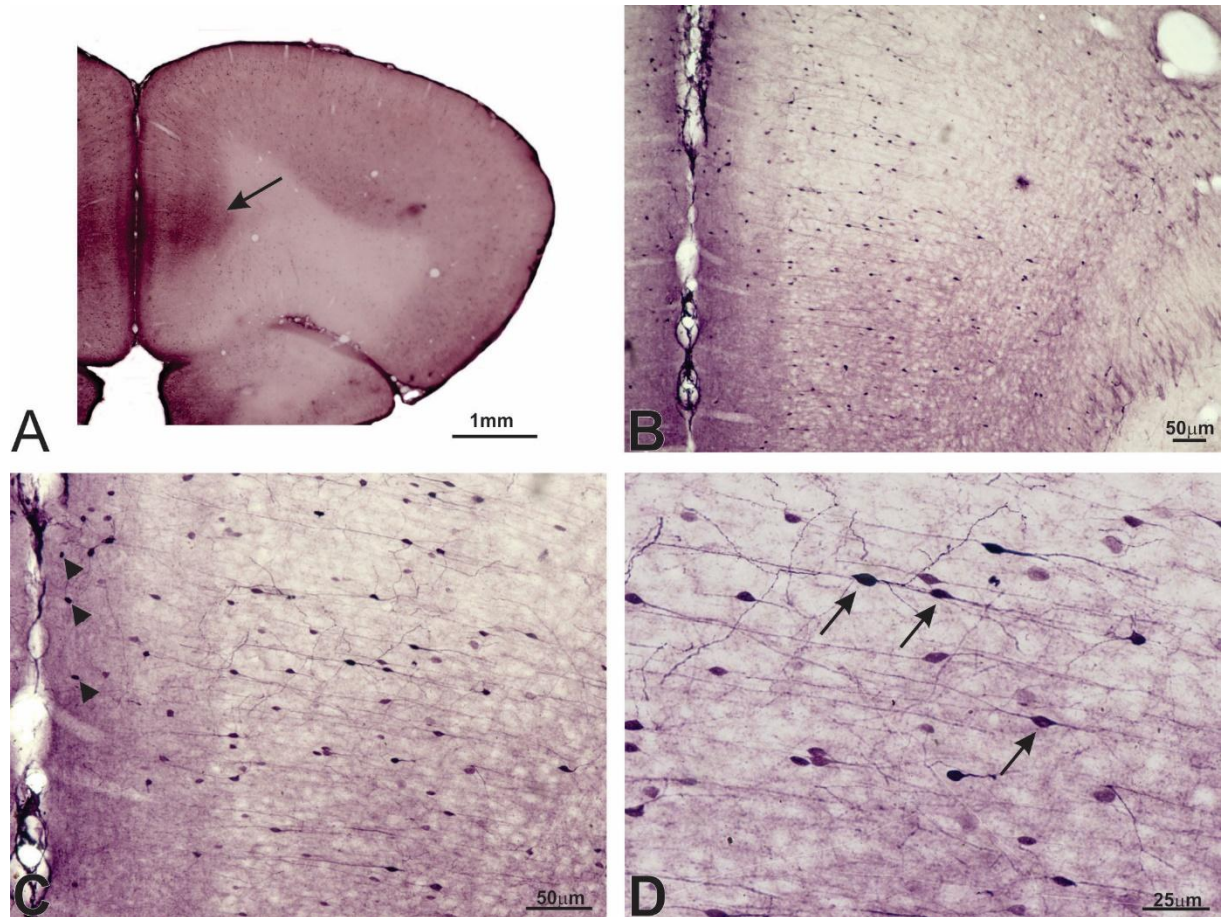


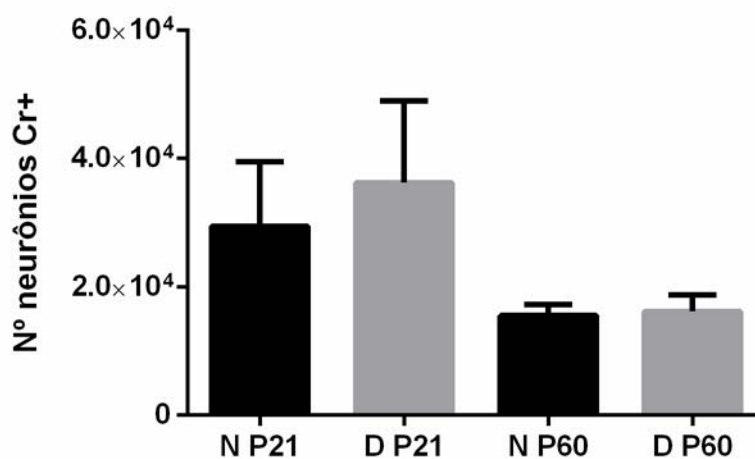
Fig. 3. Fotomicrografias de cortes de encéfalo de ratos normais de 60 dias de idade, com técnica imunohistoquímica para a evidência de calretinina (Cr). Em **A** corte em pequeno aumento mostrando o hemiencéfalo esquerdo, ao nível do córtex pré-frontal. Observar área de marcação mais intensa (seta), cujos limites correspondem aproximadamente aos da área PrL. Em **B**, **C** e **D** imagens em maior aumento onde podem ser observados corpos celulares, fibras e neuropilo. Observar em **B** e **C** fibras e corpos celulares na camada I, com morfologia semelhante ao tipo descrito como células de Cajal-Retzius (cabeças de seta em **C**). Nas outras camadas predominam neurônios bipolares (setas em **D**; coordenada (aprox.) AP Bregma +4,1).

Aspectos quantitativos

Nossos resultados mostram que a DPPN não alterou significativamente o número de neurônios imunorreativos para calretinina nos grupos de 21 e 60 dias, conforme pode ser observado nos dados estatísticos abaixo apresentados.

Tabela e gráfico 7. Número de neurônios Cr+ em animais nutridos (N) e desnutridos (D) aos 21 e 60 dias.

	N P21	D P21	N P60	D P60
Animal 1	38852,	23355,	16580,	13934,
Animal 2	44811,	56130,	14074,	*
Animal 3	20727,	27491,	13273,	15725,
Animal 4	24208,	32705,	16388,	15412,
Animal 5	26934,	30291,	18075,	20611,
Animal 6	21016,	47426,	15056,	15489,
Média± Desvio padrão	29420±4104	36230±5200	15574±1774	16234±2546



Representação gráfica dos dados relativos ao número de neurônios Cr+ nos animais nos grupos Nutrido (N) e Desnutrido (D) com 21 e 60 dias (diferenças não significativas entre os grupos).

Parvalbumina

Aspectos morfológicos

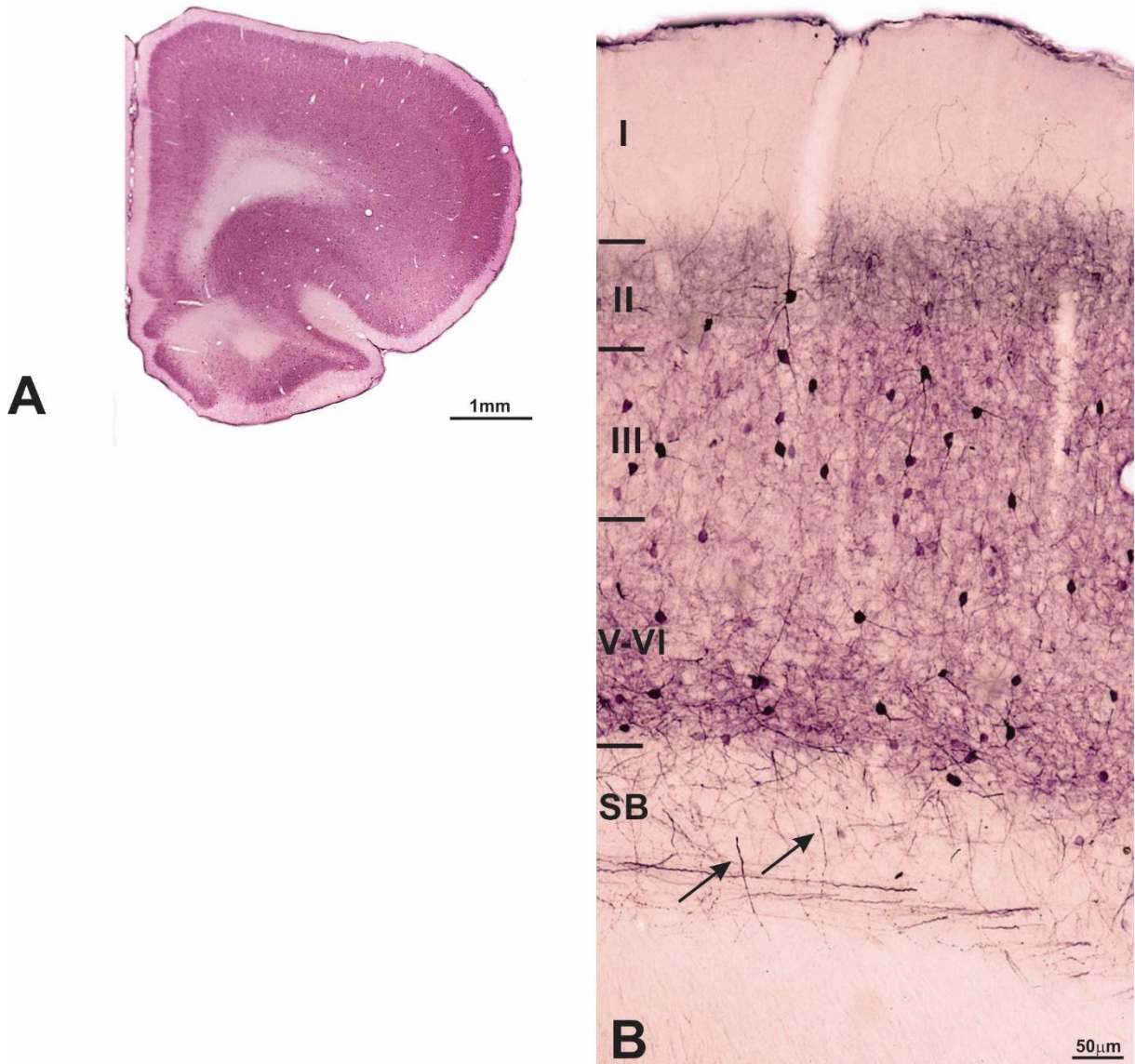


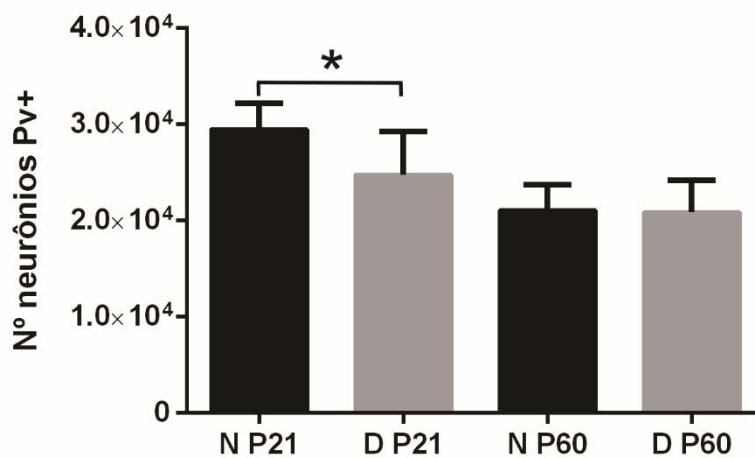
Fig. 5. Fotomicrografias de corte de encéfalo de ratos normais de 60 dias de idade, com técnica imunohistoquímica para a evidência de parvalbumina (Pv). Em **A** corte em pequeno aumento mostrando o hemiencéfalo esquerdo, ao nível do córtex pré-frontal. Em **B** podem ser observados corpos celulares, fibras e neuropilo. Foram representados os limites aproximados das camadas corticais. Observar a heterogeneidade na marcação. Embora possam ser encontrados corpos celulares em todas as camadas, eles parecem predominar nas camadas II e III. Já o neuropilo apresenta uma banda mais intensa na camada II e outra em VI, no limite com a substância branca (SB), na qual podemos observar rico plexo de fibras cursando em vários sentidos. Em muitas dessas fibras é possível visualizar dilatações sinápticas (setas; coordenada AP Bregma (aprox.) +3,7).

Aspectos quantitativos

Nossos resultados mostram que a desnutrição proteica provocou uma diminuição significativa ($p < 0.05$) no número de neurônios imunorreativos para parvalbumina no grupo de 21 dias, com recuperação estatística em P60.

Tabela e gráfico 8. Número de neurônios Pv+ em animais nutridos (N) e desnutridos (D) aos 21 e 60 dias.

	N P21	D P21	N P60	D P60
Animal 1	31008,	30420,	22081,	18601,
Animal 2	27530,	20935,	21436,	26124,
Animal 3	28315,	22005,	17420,	23667,
Animal 4	30221,	26050,	19611,	17397,
Animal 5	26412,	29354,	20753,	19845,
Animal 6	33684,	19939,	25256,	19751,
Média ± Desvio padrão	29528 ± 2650	24784 ± 4478	21093 ± 2616	20898 ± 3315



Representação gráfica dos dados relativos ao número de neurônios Pv+ nos animais nos grupos Nutrido (N) e Desnutrido (D) com 21 e 60 dias (diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos N e D aos 21 dias, com recuperação estatística ($p > 0.05$) em P60).

5 Discussão

5.1. Dados ponderais

Embora os efeitos da desnutrição proteica sobre os pesos corporais e cerebrais foram já abundantemente descritos na literatura, a apresentação dos resultados ponderais revelam o impacto real do modelo adotado. A utilização de nosso modelo experimental de DPPN com baixos níveis dietéticos de proteína (5% de caseína) durante todo o período pré-natal e pós-natal (E0-P60) sem suplementação nutricional, levou a uma redução drástica no peso corporal em P21 (64%) e uma redução ainda mais pronunciada no P60 (86%) (tabela e gráfico 1). Esta redução foi mais profunda do que a descrita em outros estudos usando diferentes modelos de desnutrição (ALAMY; BENGELLOUN, 2010).

A redução no peso do cérebro de nossos animais desnutridos (23% no P21 e 38% no P60) (tabela e gráfico 2) já era esperada considerando a gravidade da privação proteica. Os resultados são consistentes com os descritos na literatura, embora seja difícil compará-los diretamente devido às diferentes metodologias experimentais utilizadas. Em geral, os estudos têm demonstrado que existe uma correlação evidente entre o peso do cérebro e a quantidade de proteína disponível durante os períodos de desenvolvimento intra e extrauterino, e que a duração da privação nutricional afeta também o peso do encéfalo (ALAMY; BENGELLOUN, 2010; LEVITSKY; STRUPP, 1995). É importante notar que a redução no peso encefálico dos nossos ratos desnutridos foi relativamente menor do que a redução observada no peso corporal tanto em P21 como em P60. Isto pode estar relacionado com mecanismos compensatórios da fisiologia fetal descritos em modelos experimentais, que indicam que o peso do encéfalo durante o período intrauterino é mantido em um nível normal apesar das variações do peso do feto (MORRISON, 2008).

5.2. Volume cortical e número de neurônios

Além da redução de peso corporal e encefálico, observamos uma diminuição muito significativa na VCPF dos animais desnutridos (tabela e gráfico 3). Em P21, a VCPF destes animais foi aproximadamente 10% menor do que nos controles ($p < 0,01$) e este valor chegou a 20% em P60 ($p < 0,01$). Esta diminuição foi em paralelo com a diminuição do VEP (15% em P21, $p < 0,05$; 24% em P60, $p < 0,01$), o que indica que a diminuição do VCPF é provavelmente não específica.

Nossos resultados estão, em geral, de acordo com os obtidos por outros autores usando diferentes modelos de privação proteica perinatal (ALAMY; BENGELLOUN, 2010).

Por exemplo, Thomas et al. (1979) observaram que embora os pesos cerebral e cerebelar diminuam significativamente em ratos desnutridos (analisado em P30), a "percentagem de volume" do córtex permanece inalterado, sugerindo um efeito alométrico.

A redução do volume cortical observada em animais desnutridos no nosso estudo pode ser explicada por três fenômenos não mutuamente excludentes: redução do número de células corticais, diminuição do tamanho do corpo das células, ou a diminuição do volume do neuropilo. Nosso estudo aponta para a ausência de redução do número total de neurônios, o que descarta a possibilidade de que a redução volumétrica observada no CPF de ratos desnutridos tenha sido provocada por uma diminuição do número dessa população celular. Estes resultados indicam que, ao contrário de outras estruturas corticais, o número de neurônios corticais não é afetada pela privação nutricional. Isto poderia ser interpretado como um exemplo de preservação neuronal durante a desnutrição usando possíveis mecanismos neuroprotetores (MORRISON, 2008).

Enquanto trabalhos pioneiros realizados nas décadas de 1960 e 1970 com base na análise de conteúdo de DNA e usando vários modelos de privação nutricional sugeriram uma redução no número de neurônios, estudos subsequentes do córtex cerebral não confirmaram essa redução (LEVITSKY et al., 1995). Entretanto, foi observado um declínio de elementos não neuronais do córtex cerebral dos animais desnutridos (BEDI; BHIDE, 1988). Por exemplo, Saissi e Saissi (1973) observaram uma diminuição significativa na glia e células endoteliais no córtex somatossensorial em P10 em ratos, usando modelo de desnutrição proteica pré-natal, mas o número de neurônios foi normal. Além disso, usando um modelo de desnutrição pós-natal precoce, Bedi et al. (1989) descreveram alterações na densidade sináptica sem alterações nos números neuronais. Diaz-Cintra et al. (1990) também observaram mudanças estruturais nas células piramidais do córtex visual, onde a complexidade dos dendritos basais e o número de espinhas dendríticas foram alteradas em ratos submetidos à desnutrição proteica durante a gestação e lactação, mas tampouco foram observadas alterações no número de neurônios.

Em resumo, os nossos resultados sugerem que a desnutrição proteica perinatal leva a uma diminuição no volume de CPF, que é proporcional à redução volumétrica de todo o encéfalo sem, não entanto, evidências para a diminuição no número de neurônios. Este resultado não deixa de ser surpreendente considerando que nosso modelo experimental causou uma profunda privação proteica durante todas as fases de desenvolvimento neurológico, incluindo a neurogênese, migração e diferenciação celular. Esta diminuição do volume cortical, sem perda neuronal poderia explicar o aumento na densidade celular cortical patológica (cell paking) descrita em vários estudos (LEUBA; RABINOWICZ, 1979; THOMAS et al., 1979; SAISSI; SAISSI, 1973)

A normalidade numérica em relação ao número de neurônios observada em nosso estudo no CPF dos ratos desnutridos contrasta com o descrito em outras regiões do encéfalo, particularmente o hipocampo (PAULA-BARBOSA et al., 1989; DÍAZ-CINTRA et al., 1991; DEBASSIO et al., 1994; DEBASSIO et al., 1996; GRESSENS et al., 1997; LUKOYANOV; ANDRADE 2000; LISTER et al., 2005; FEOLI et al., 2008). Já foi documentado que a desnutrição proteica durante o desenvolvimento provoca alterações morfológicas e bioquímicas significativas nas estruturas hipocâmpais, como as células granulares do giro dentado e as populações de neurônios piramidais nas áreas CA3 e CA1. Essas alterações incluem a redução do número de células, diferenciação celular anormal, e uma diminuição na complexidade sináptica e dendrítica. Essas alterações estruturais estão correlacionadas com déficits em funções de aprendizagem e memória, onde o hipocampo desempenha um papel muito significativo.

Entre as PLCs, apenas a Pv apresentou nos animais desnutridos uma diminuição numérica significativa em P21 (Tabela e gráfico 9) com normalização estatística em P60 (Tabela e gráfico 10). Como foi comentado na Introdução deste estudo, alterações na população de neurônios que expressam Pv têm um papel relevante na etiologia de diversas doenças psiquiátricas, fundamentalmente na esquizofrenia (para revisão ver LEWIS, 2010). Estudos anteriores mostraram alterações numéricas consistentes de neurônios sintetizadores de Pv no giro dentado (CARDOSO et al., 2013), mas não nas áreas CA3/2 e CA1 do hipocampo (LISTER et al., 2011) em modelos de desnutrição proteica, sendo que os do presente estudo são os primeiros a analisar essa população no CPF de roedores em modelo de DPPN.

Como descrevemos anteriormente, dos tipos neuronais Pv+ descritos no córtex cerebral, as células em candelabro têm a capacidade de controlar o output das pirâmides corticais. Esta influência é fundamentalmente inibitória e relaciona-se ao fato da quase totalidade dos

neurônios que expressam PLCs serem gabaérgicos. Como já foi mencionado, alguns estudos têm mostrado alterações numéricas nestas populações neuronais em pacientes esquizofrênicos (DAVISS e LEWIS, 1995; BEASLEY e REYNOLDS, 1997; KALUS et al., 1997; WOO e et al., 1997; DANOS et al., 1998; WOO et al., 1998; IRITANI et al., 1999; REYNOLDS e BEASLEY, 2001). Entretanto, algumas limitações nesses trabalhos no que diz respeito aos sistemas de quantificação utilizados e à falta de uma comparação com o número total de neurônios tornam os resultados ainda especulativos. Nossa quantificação estereológica indicou que o número de neurônios Pv+ foi inferior nos animais desnutridos (Tabelas e gráficos 9 e 10), mas o fato de não existirem diferenças significativas na população geral de neurônios revelado pela técnica de NeuN (Tabelas e gráficos 7 e 8) sugere que esse menor número possa estar relacionado com uma menor expressão da Pv. As eventuais consequências que uma diminuição na síntese dessa PLC no córtex cerebral nas fases iniciais de desenvolvimento ainda não são conhecidas, mas é válido supor que se essa redução está associada a uma alteração no sistema gabaérgico, a falta de uma ação inibitória em períodos críticos na formação da circuitaria cortical poderia afetar o funcionamento normal em fases posteriores da vida do indivíduo.

Em nosso estudo não observamos nenhuma alteração significativa no número de neurônios Cb+ e Cr+. Nosso interesse ao analisar quantitativamente estas populações neuronais estava centrado na capacidade neuroprotetora das PLCs. Mattson et al (1991) demonstraram in vitro que neurônios hipocâmpais Cb+ eram mais eficazes na redução da concentração do Ca_{2+} intracelular quando comparados a células Cb-. Como já mencionamos anteriormente a função de tamponamento do cálcio intracelular verificada em diversos estudos (MARSDEN et al., 1990; HOF et al., 1999.), possivelmente representa um fator crucial para a sobrevivência

de neurônios, já que este íon é tóxico quando encontrado em grandes quantidades no citoplasma celular. Para neutralizar a ação do íon, algumas PLCs modificam sua conformação estrutural de forma a se ligar aos íons de cálcio presentes no citoplasma, diminuindo assim sua concentração intracelular, o que contribui para a função neuroprotetora.

Como foi também observado nos estudos de Dowd et al (1992; 1995), neurônios sintetizadores de Cb demonstram uma taxa atenuada na apoptose celular durante situações decorrentes do estresse oxidativo. Esta ação neuroprotetora foi confirmada por Berger et al (1998), os quais verificaram que neurônios do hipocampo após transfecção com Cb cDNA mostraram uma maior capacidade de tamponamento de cálcio, e uma maior resistência a processos citotóxicos e apoptóticos (LUKAS; JONES, 1994; HOF et al, 1996).

A normalidade observada em nosso estudo em relação à população Cb e Cr⁺ no CPF difere também em relação ao descrito no hipocampo. De fato, Hipólito-Reis et al. (2013), observaram em modelo de desnutrição proteica pós-natal uma diminuição da população Cr⁺ na camada molecular do giro dentado.

Estas diferentes respostas no CPF e hipocampo após desnutrição podem ser explicadas pelos diferentes padrões de proliferação, migração, e diferenciação observados nessas estruturas, um fato já documentado em outras regiões do cérebro (GIUFFRIDA et al., 1980; MORGANE et al., 2002). Estas diferenças regionais não são surpreendentes uma vez que vários neuropatologias e distúrbios neurodegenerativos ocorrem frequentemente em regiões específicas do cérebro, e que em resposta à mesma lesão, a reatividade regional de neurônios e células da glia pode ser diferente (PINATO et al., 2015; KIPP et al., 2008).

6 Conclusões

Em relação aos objetivos propostos, nosso estudo permite concluir que, de acordo com a metodologia adotada:

- a) O modelo de desnutrição provocou alterações significativas no peso corporal e encefálico nos ratos desnutridos, assim como no volume do CPF.
- b) Não foram observadas diferenças significativas no número **total** de neurônios conforme técnicas para evidenciação de NeuN, nem no número de neurônios que expressam as PLCs calbindina e calretinina.
- c) Foram observadas em P21 diferenças significativas no número de neurônios que expressam a PLC parvalbumina, com normalização estatística em P60.
- d) Algumas das alterações observadas em animais desnutridos (diminuição volumétrica do CPF e alteração na população de neurônios Pv+) são similares às descritas em pacientes esquizofrênicos. Isto indica, junto com outros resultados disponíveis na literatura, que modelos de DPPN não são apenas importantes para compreender o impacto da desnutrição sobre o SNC, mas também para analisar alterações no neurodesenvolvimento que estão associadas com a esquizofrenia e outros distúrbios psiquiátricos.

Referências

- ALAMY, M.; BENGELLOUN, W. A. Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. **Neurosci. Biobehav. R.**, v. 36, n. 6, p. 1463-80, 2010.
- BEASLEY, C. L.; REYNOLDS, G. P. Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. **Schizophr. Res.**, v. 24, p. 349 –355, 1997.
- BEDI, K. S.; MASSEY R. F.; SMART J. L. Neuronal and synaptic measurements in the visual cortex of adult rats after undernutrition during normal or artificial rearing. **J Comp Neurol**; v. 1, n. 289, p. 89-98, 1989.
- BEDI, K. S.; BHIDE, P. G. Effects of environmental diversity on brain morphology. **Early Hum Dev.**v. 17, p. 107-43, 1988.
- BERGER, F.; GAGE, F. H.; VIJAYARAGHAVEN, S. Nicotinic receptor- induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 6871–6881, 1998.
- BRIAN, J. M.; GARY S. S.; BRIAN D. S. Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments. **Biochemistry and Cell Biology**. v. 3, n. 68, p. 587-601, 10.1139/o90-084, 1990.
- CARDOSO, A. et al. Prolonged protein deprivation differentially affects calretinin- and parvalbumin-containing interneurons in the hippocampal dentate gyrus of adult rats **Neuroscience Letters**.; v. 555, p. 154– 158, 2013.
- CRUZ-RIZZOLO, R. J. et al. Cyto-, myelo- and chemoarchitecture of the prefrontal cortex of the Cebus monkey **BMC Neuroscience**; v. 12, p. 6, 2011.
- DANOS, P. et al. Schizophrenia and anteroventral thalamic nucleus: selective decrease of parvalbumin-immunoreactive thalamocortical projection neurons. **Psychiatry. Res.**, v. 82, p. 1 –10, 1998.
- DAVISS, S. R.; LEWIS, D. A. Local circuit neurons of the prefrontal cortex in schizophrenia: selective increase in the density of calbindin-immunoreactive neurons. **Psychiatry. Res.**, v. 59, p. 81 – 96, 1995.
- DEBASSIO, W.A. et al. Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. **Brain. Res.**, v. 41, n. 6, p. 379–383, 1996.

DEBASSIO, W.A. et al. Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. **Brain. Res.**, v. 35, n. 1, p. 57–61, 1994.

DÍAZ-CINTRA, S. et al. Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J Comp Neurol.*, n. 310, p. 356-364, 1991.

DÍAZ-CINTRA, S. et al. Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. *J Comp Neurol.*, v. 1, n. 292, p.117-26, 1990.

DOWD, D.R. et al. Stable expression of the calbindin-D28K complementary DNA interferes with the apoptotic pathway in lymphocytes. *Mol. Endocrinol.*, v.6 p. 1843–1848, 1992.

EYLES, D. W.; MCGRATH, J. J.; REYNOLDS, G. P. Neuronal calcium-binding proteins and schizophrenia. **Schizophr**, v. 57, p. 27-34, 2002.

FAO, IFAD e WFP. The State of Food Insecurity in the World 2014. Strengthening the enabling environment for food security and nutrition. Rome, FAO. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i4030e.pdf>, 2014.

FEOLI, A.M. et al. Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. *Brain. Research.*, v. 1187, n. 2, p. 33–41, 2008.

GIUFFRIDA, A. M. et al. Effects of undernutrition on nucleic acid synthesis in neuronal and glial cells from different regions of developing rat brain. *Nutr Metab.*, v.3, n.23, p. 189-98, 1980.

GRESSENS, P. et al. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.*, v. 103, p. 21-35, 1997.

HARRISON, P. J. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. **Brain.**, v. 122, p. 593-624, 1999.

HOF, P.R. et al. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *Journal of Chemical Neuroanatomy.*, v. 16, p. 77–116, 1999.

IRITANI, S. et al. Calbindin immunoreactivity in the hippocampal formation and neocortex of schizophrenics. *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, v. 23, p. 409 – 421, 1999.

KALUS, P.; SENITZ, D.; BECKMANN, H. Altered distribution of parvalbumin - immunoreactive local circuit neurons in the anterior cingulate cortex of schizophrenic patients. **Psychiatry. Res.**, v. 75, p. 49–59, 1997.

KIPP, M. et al. Brain-region-specific astroglial responses in vitro after LPS exposure. **J Mol Neurosci.**, v. 2, n. 35, p. 235-43, 2008.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. **J. Comp. Neurol.**, v. 172, p. 687-722, 1977.

LAUS, M. F.; VALES, L. D.; COSTA, T. M.; ALMEIDA, S. S. Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies. **Int J Environ Res Public Health.**, v. 2, n. 8, p. 590-612, 2011.

LEUBA, G.; RABINOWICZ, T. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. I. Cellular densities, cortical volume and total numbers of cells. **Exp Brain Res.**, v. 37, p. 283-98, 1979.

LEVITSKY, D. A.; STRUPP, B. J. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. **J Nutr**; v. 8, n. 125, p. 2212S-2220S, 1995.

LEWIS, D. A. Chandelier cells: shedding light on altered cortical circuitry in schizophrenia. **Mol. Psychiatry.**, v. 3, p. 468–471, 1998.

LEWIS, D. A. The chandelier neuron in schizophrenia. **Dev. Neurobiol.**, v. 71, p. 118-27, 2011.

LISTER, J. P. et al. Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. **Hippocampus.**, v. 15, n. 3, p. 393-403, 2005.

LUKAS, W., JONES, K.A.. Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro. **Neuroscience.**, v. 61, p. 307–316, 1994.

LUKOYANOV, N. V.; ANDRADE, J. P. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. **Behav. Brain. Res.**, v. 112, p. 85–97, 2000.

LUND, J. S.; LEWIS, D. A. Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: golgi and immunocytochemical characteristics. **J. Comp. Neurol.**, v. 328, p. 282 – 312, 1993.

MATTSON, M.P. et al. Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28K in cultured hippocampal neurons. **Neuron.**, v. 6, p. 41–51, 1991.

MORGANE, J. P.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 26, p. 471-83, 2002.

MORRISON, J. L. Sheep models of intrauterine growth restriction: fetal adaptations and consequences. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.*, v. 35, p. 730–743, 2008.

NEUGEBAUER, R.; HOEK, H. W.; SUSSER, E. Prenatal exposure to wartime famine and development of antisocial personality disorder in early adulthood. *JAMA.*, v. 282, p. 455-62, 1999.

NIMCHINSKY, E. A. et al. Neurofilament and calcium-binding proteins in the human cingulate cortex. **Journal of Comparative Neurology.**, v. 384, n. 4, p. 597–620, 1997.

PAULA-BARBOSA, M. M.; ANDRADE, J. P.; CASTEDO, J. L. Cell loss in the cerebellum and hippocampal formation of adult rats after long-term low protein diet. *Exp. Neurol.*, v. 103, p. 186–193, 1989.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. San Diego: Academic Press; 1998.

PEREZ-CRUZ, C. et al. Morphology of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: lateralized dendritic remodeling by chronic stress. **Neural. Plast.**, p. 46276, 2007.

PINATO, L. et al. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. **Brain Struct Funct**; v. 2, n. 220, p. 827-40, 2015.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. JR. Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.*, v. 11, n. 123, p. 1939-51, 1993.

REYNOLDS, G. P.; BEASLEY, C. L. Gabaergic neuronal subtypes in the human frontal cortex – development and deficits in schizophrenia. *J. Chem. Neuroanat.*, v. 22, p. 95 –100, 2001.

RICE D.; BARONE, S. JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health. Persp.*, v. 3, p. 511-33, jun. 2000.

ROSENE, D. L. et al. Prenatal protein malnutrition in rats alters the c-Fos response of neurons in the anterior cingulate and medial prefrontal region to behavioral stress. *Nutr. Neurosci.*, v. 7, p. 281–289, 2004.

SAISSI, F.; SAISSI, B. Differential effects of protein-calorie restriction and subsequent repletion on neuronal and nonneuronal components of cerebral cortex in newborn rats. *J Nutr*; v. 103, p. 1625-1633, 1973.

ST CLAIR, D. et al. Rates of adult esquizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959-1961. *Jama.*, v. 294, p. 557-62, 2005.

SUSSER, E. et al. Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch. Gen. Psychiat.*, v. 53, p. 25-31, 1996.

SWANSON, L.W. *Brain Maps*, 3rd Edition; Academic Press, 2003.

THE FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *World Food Summit (1996)*. Available from: <http://www.fao.org/wfs/>

THOMAS, Y. M. et al. A stereological analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and cerebellar cortex of weanling rats undernourished. *Early Hum Dev*; v. 3, p. 109-26, 1979.

UYLINGS, H. B.; GROENEWEGEN, H. J.; KOLB, B. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain. Res.*, v. 146, p. 3-17, 2003.

WEST, M. J.; SLOMIANKA, L.; GUNDERSEN, H. J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.*, v. 231, p. 482-97, 1991.

WOO, T. U.; MILLER, J. L.; LEWIS, D. A. Schizophrenia and the parvalbumin-containing class of cortical local circuit neurons. *Am. J. Psychiat.*, v. 154, p. 1013– 1015, 1997.

WOO, T. U. et al. A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 5341–5346, 1998.