

LAÍS LEAL LIMIERI

**Efeito da desnutrição proteica sobre a
população de astrócitos no córtex
pré-frontal de ratos**

Araçatuba-SP

2015

LAÍS LEAL LIMIERI

**Efeito da desnutrição proteica sobre a
população de astrócitos 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

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **André e Lilian**.

Para mais essa etapa concluída vocês foram, como sempre, fundamentais. Assim como em toda minha caminhada quando tropecei, vocês incessantemente ali estavam para me estender as mãos. Pelo amor, paciência, compreensão, entendimentos, carinho e dedicação de uma vida. Aprendi que não temos a necessidade de sermos somente alguém com amplo conhecimento de uma área escolhida, mas também que precisamos ser pessoas que fazem a diferença na sociedade, sempre levando o bem. Tudo que sou e tudo que tenho devo a vocês. Palavras não existem para declarar a gratidão e o amor. Muito obrigado.

Ao meu amigo **Igor**,

que me acompanhou nos momentos mais complexos de todo esse projeto de vida. Seu apoio nessa conquista foi imprescindível. Cresço cada dia com seus ensinamentos, sendo meu exemplo de caráter, conduta e superação. Admiração infinita. Agradeço constantemente por ter te conhecido. De forma indiscutível, meus agradecimentos sinceros.

Às minhas amigas **Isabela, Jessica e Taís**,

que tornaram possível a realização deste trabalho, participando de todas as etapas laboratoriais com dedicação, seriedade e competência. Com vocês aprendi que tudo tem algo a ser ainda encontrado e que aqui não estamos apenas por uma simples passagem. Obrigada por me proporcionarem momentos especiais tornando irmãs que não possuo e que levarei comigo por toda a vida. Agradecimentos eternos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus,

por iluminar meus passos e ter tornado tudo isso que inicialmente pareceu impossível, possível. Sou infinitamente grato pelas pessoas que colocastes em meu caminho e pelas experiências boas e também as ruins, as quais foram fundamentais no aprendizado até o momento. Obrigada pelas oportunidades de exercitar a humildade, fé e dignidade.

Ao Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo,

pela paciência, sabedoria e tranquilidade com que conduziu a orientação nesses longos anos de convivência. Por ter confiado e acreditado no meu potencial e feito parte não apenas da minha formação, mas da minha vida. Não foram apenas orientações laboratoriais, mas também pessoais no qual me incentivou a sonhar e querer sempre o meu crescimento pessoal e profissional. A você não dedico e agradeço apenas esse trabalho, mas sim todo o meu amadurecimento. Pouquíssimos instantes difíceis passamos, mas saiba que jamais influenciou negativamente em qualquer aspecto. Apreendi muito com o senhor. Com certeza é e será meu exemplo. Mais uma vez, muito obrigada.

Ao amigo Miguel Antônio Xavier de Lima,

que foi o grande responsável pelo início do meu trabalho, me ensinou todos os passos laboratoriais e participou ativamente dos meus primeiros passos científicos. Ajudou e colaborou com tudo. Mesmo estando distante será sempre lembrado. Sou muito grata a você. Obrigada.

Ao amigo Gestter Willian Lattari Tessarin

pois todo esse trabalho não seria realizado sem vossa imensa ajuda em cada etapa de confecção. Você contribuiu muito com minha formação. Educação, honestidade, companheirismo e palavras tonaram o ambiente de trabalho algo fantástico. Com certeza coisas boas o aguardam no futuro. Obrigada!

Às amigas **Isabela Rogério de Paiva, Taís Fernandes Pimenta e Jéssica de Oliveira Barbosa Ribeiro,**

que novamente agradeço à cumplicidade, amizade e principalmente o empenho no qual realizaram esse projeto. Foram fins de semana trabalhados, sempre com muita alegria, dias inteiros juntas que com muita parceria tornavam o ambiente de trabalho sempre muito agradável. Sentia alegria ao me deslocar até aqui e encontrá-las. Obrigada pela confiança, respeito e irmandade construída nesse período de graduação e pelos bons momentos compartilhados em Araçatuba. Torço por vocês e tenho certeza que construímos uma amizade sólida e incontestável.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de sua Diretora Prof^a. Dra. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e Vice-Diretor Prof. Tit. Wilson Roberto Poi, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

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**, tornando possível a realização desse projeto e de um sonho.

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, na pessoa do Chefe de Departamento Prof. Adj. Cláudio Aparecido Casatti que possibilitou a execução de toda parte experimental do presente trabalho com adendo especial às disciplinas de Anatomia.

Ao **Prof. Ass. Dr. Cláudio Aparecido Casatti**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, que entre momentos e outros colaborou intensamente com o desenvolvimento deste projeto, assim como fez parte da realização de um grande sonho. Muito obrigada.

Ao **Prof. Ass. Dra. Alaíde Gonçalves**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, com quem muitas conversas frutíferas geraram força e ânimo para percorrer mais um pedaço do caminho. Muito obrigada.

Ao **Prof. Titular Dr. José Américo de Oliveira**, da **Disciplina de Anatomia**, pelos inúmeros ensinamentos de Anatomia, do qual sou grata desde o princípio e eternamente. Junto a ele aprendi mais claramente o quão importante é tornarmos cidadãos, além de profissionais qualificados. Muito obrigada.

Ao **Prof. Ass. Dr. Paulo Roberto Botacin**, da **Disciplina de Anatomia**, que contribuiu de forma ilustre para minha formação acadêmica e também para a formação do caráter que hoje possuo. Muito obrigada.

A **Prof. Ass. Dr. Roberta Okamoto**, da **Disciplina de Anatomia**, que chegou na parte final dessa caminhada, orientou e ajudou com toda dedicação e carisma contribuindo com meus conhecimentos. Obrigada.

Ao **Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, pela ajuda laboratorial, nos esclarecimentos de inúmeras dúvidas que emergiram para o desenvolvimento deste trabalho, nas perfusões e reações imuno-histoquímicas. Pela sabedoria. Muito obrigada.

Aos **Servidores do Departamento de Ciências Básicas**, André Luís Mattos Piedade, Arnaldo César dos Santos, Sandra Aparecida dos Santos Pinheiro, Eliseide Maria Ferreira Silva Navega que contribuíram com respeito e humildade não só para a realização desta pesquisa, mas também para com minha formação. Em especial agradeço a **José Ari Gualberto Junqueira** que também fez parte dos meus conhecimentos adquiridos de Anatomia e que ofereceu imagens de alta qualidade para ilustrar algumas aulas durante a graduação, assim como peças anatômicas, nas quais pude estudar de forma profunda. Obrigada.

Enfim, aos **animais** desse experimento, meu profundo respeito.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan.

LIMIERI, L. **Efeito da desnutrição proteica sobre a população de astrócitos no córtex pré-frontal de ratos. 2015.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

A desnutrição proteica perinatal (DPPN) representa um grave flagelo para boa parte da humanidade, afetando crianças nas fases mais vulneráveis do desenvolvimento cerebral. Estudos recentes têm apontado para o fato que a desnutrição proteica tanto no período intrauterino como nas primeiras fases da infância está associada a alterações comportamentais, dos processos de aprendizado e memória e de outras funções cognitivas. Paralelamente, estudos experimentais e clínicos indicam uma relação entre quadros de DPPN e o aparecimento tardio de doenças psiquiátricas como o autismo e a esquizofrenia. Este estudo visou estabelecer se as alterações estruturais encontradas no córtex pré-frontal de pacientes com essas condições clínicas podem ser reproduzidas em modelos experimentais de desnutrição proteica. Para isto, em modelo de DPPN em ratos, analisamos mediante quantificação estereológica populações gliais da região do córtex pré-frontal, afetadas nessas situações. Esta análise permitiu quantificar a população astrocitária evidenciada pela técnica imuno-histoquímica para a proteína ligante de cálcio S100B, considerada um eficiente marcador de astrócitos no córtex cerebral. Nossos resultados indicam que o modelo de desnutrição proteica utilizado levou a uma diminuição muito significativa no peso corporal e encefálico nos ratos desnutridos. Paralelamente foi observada uma diminuição significativa no número de astrócitos S100B+ nos animais desnutridos na idade P21, com normalização estatística em P60.

Palavras-chave: Desnutrição. Córtex pré-frontal. Astrócitos. Esquizofrenia, S100B

LIMIERI, L. **The effects of protein malnutrition on the astrocytic population of the rat prefrontal cortex.** 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

Abstract

Perinatal protein malnutrition (PPM) is considered a serious public health concern, affecting children on the most vulnerable stages of brain development. Recent studies indicate that protein malnutrition -both in the intrauterine period as in the early phases of infancy- is associated with disorders in learning and memory processes and behavior, as well as other cognitive functions. In addition, experimental and clinical studies indicate a relationship between PPM and the late onset of psychiatric disorders such as autism and schizophrenia. This study aimed to establish if some of the structural changes found in the prefrontal cortex (PFC) of patients with these medical conditions could be reproduced in experimental models of protein malnutrition. Thus, in the present study, using a model of rat PPM, immunohistochemical techniques, and unbiased stereological analysis we quantified the astrocytic population immunoreactive for S100B, considered an efficient astrocyte marker in the cerebral cortex. Our results indicate that our PPM model led to a significant decrease in body and brain weight in malnourished rats. In addition, we observed a significant decrease in the number of astrocytes S100B+ in malnourished animals at P21, with statistical normalization at P60.

Keywords: Malnutrition, Prefrontal cortex, Astrocytes, Schizophrenia, S100B

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Corte frontal de hemiencéfalo de rato de 21 dias, mostrando a delimitação da Região de Interesse (ROI) utilizada neste estudo. 18
- Figura 2** - Astrócitos no córtex cerebral de ratos controle de 21 dias, evidenciados mediante técnica imuno-histoquímica para proteína ligante de cálcio S100B. 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Peso corporal de ratos nutridos e desnutridos na idade P21	20
Tabela 2. Peso corporal de ratos nutridos e desnutridos na idade P60	20
Tabela 3. Peso encefálico de ratos nutridos e desnutridos na idade P21	21
Tabela 4. Peso encefálico de ratos nutridos e desnutridos na idade P60	22
Tabela 5. Número de astrócitos S100B+, grupo de 21 dias.	24
Tabela 6. Número de astrócitos S100B+, grupo de 60 dias.	24

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Representação gráfica dos dados relativos ao peso corporal dos animais 21
nutridos (N) e desnutridos (D), com 21 e 60 dias de idade. Diferenças extremamente
significativas ($P < 0,0001$) foram observadas entre os animais nutridos e desnutridos tanto na
idade P21 como P60.
- Gráfico 2** - Representação gráfica dos dados relativos ao peso encefálico dos animais 22
nutridos (N) e desnutridos (D), com 21 e 60 dias de idade. Foram observadas diferenças
extremamente significativas ($P < 0,0001$) entre os animais nutridos e desnutridos tanto na
idade P21 como P60.
- Gráfico 3** - Representação gráfica dos dados relativos ao número de astrócitos nos 25
animais nutridos (N) e desnutridos (D). Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$)
apenas no grupo de 21 dias, com normalização estatística em P60.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAd = anterior cingulate área, dorsal part

ACx = Anterior Cingular córtex

AIN = American Institute of Nutrition

Cg1 = cingulate cortex, area 1

Cg2 = cingulate cortex, area 2

CPf = Córtex pré-frontal

D = desnutridos

DMSO = DIMETIL-SULFATO

DPPN = Desnutrição proteica perinatal

IL = infralimbic córtex

MO = medial orbital córtex

Mos = secondary motor área.

N = nutridos

PrL = prelimbic córtex

ROI = Region of Interest (Região de interesse)

SNC = Sistema Nervoso Central

TDAH = Transtorno do déficit de atenção/hiperatividade

SUMÁRIO

1	Introdução	10
2	Metodologia	14
3	Resultados	20
4	Discussão	26
5	Conclusão	31
	Referências	

1 Introdução

Os problemas nutricionais, fundamentalmente aqueles relacionados com insuficiências proteicas e calóricas, continuam representando um grave flagelo para boa parte da humanidade. Considerando essa situação, a Organização das Nações Unidas estabeleceu como uma das metas do milênio reduzir em 50% a prevalência da subnutrição em crianças menores de cinco anos até o ano de 2015 (Millennium Development Goals). Não obstante, estudos recentes indicam que essas metas não serão alcançadas, nem mesmo em regiões desenvolvidas (DE ONIS et al., 2004).

Problemas nutricionais, que chegam a ser dramáticos em países em desenvolvimento, são também observados em regiões industrializadas, onde setores da população sofrem pela carência generalizada ou específica de determinados nutrientes (MORGANE et al., 2002). Assim, resulta aparentemente desnecessário reforçar a importância que adquirem os estudos sobre os problemas relacionados com a desnutrição infantil.

A desnutrição é um dos fatores não genéticos que mais afetam o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC; MORGANE et al., 2002), sendo que as últimas décadas têm testemunhado um avanço importante em nosso conhecimento sobre como isto acontece, seja como resultado do uso de modelos experimentais ou pela análise de estudos clínicos.

Entre outras alterações, foi observado que a desnutrição proteica fetal ou pós-natal precoce (por simplificação aqui denominada perinatal, DPPN) causa uma redução irreversível no peso do cérebro (determinado pelo conteúdo de DNA) e na proliferação dendrítica, bem como um retardo no processo de mielinização (ZAMENHOF et al., 1968 e WINICK et al., 1972), e uma redução significativa da espessura do córtex cerebral em filhotes de ratos, com redução permanente no número de neurônios (CLARK et al., 1973).

Salas et al. (1974) observaram que a desnutrição proteica neonatal provoca modificações comportamentais além de alterações neuroquímicas e hormonais tais como a diminuição do conteúdo de DNA cerebelar (indicativo do número de células), redução do volume do telencéfalo e dos níveis de proteína cerebral, e redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cerebelo.

Lai e Lewis (1980) ao estudarem o efeito da desnutrição durante o período pré e pós-natal sobre as fibras nervosas do corpo caloso de ratos verificaram uma redução no diâmetro do axônio em relação à bainha de mielina (índice G).

Yamano et al. (1980) avaliaram ultraestruturalmente os efeitos da desnutrição proteica materna sobre o desenvolvimento do córtex cerebral de embriões de camundongos e verificaram um atraso na maturidade neuronal, enquanto que Lepri et al. (1994) observaram que a desnutrição proteica pré e pós-natal provoca modificações no desenvolvimento cerebelar de ratos, assim como alterações nos processos migratórios das camadas corticais.

Mais recentemente, Andrade et al. (2002) observaram em ratos submetidos a uma dieta hipoproteica prolongada (36 semanas), que o hipocampo sofre alterações morfológicas significantes. Relataram também uma redução dos prolongamentos dendríticos das células granulares e um aumento na densidade desses prolongamentos nas células piramidais da camada molecular externa do giro denteado.

Esses estudos parecem reforçar a ideia que a desnutrição, fundamentalmente a proteica, afeta o desenvolvimento cerebral quando atinge crianças em fases críticas de maturação encefálica, tanto no período intrauterino como nos primeiros anos da infância, levando a alterações comportamentais, dos processos de aprendizado e memória e de outras funções cognitivas (MORGANE et al., 2002).

As estruturas límbicas parecem ser particularmente afetadas na DPPN. Em modelos experimentais, o hipocampo tem sido alvo preferencial dessas investigações. Isto fundamentalmente devido a dois fatores, a participação dessa estrutura em processos relacionados com a memória e o aprendizado –funções cognitivas reconhecidamente alteradas pela desnutrição pré-natal- e ao conhecimento satisfatório que existe sobre a arquitetura, conectividade e estrutura química dessa região, o que facilita análises comparativas entre grupos de animais normais e desnutridos (MORGANE et al., 2002).

Posteriormente, entretanto, foi constatado que outras estruturas límbicas como o córtex pré-frontal (CPf) e o córtex cingular podem apresentar alterações estruturais em modelos de DPPN (ROSENE et al, 2004; MOKLER et al., 2007). Paralelamente foram também observadas em modelos de DPPN alterações no sistema de neurotransmissão dopaminérgica (MOKLER

et al., 2007), serotoninérgica (DÍAZ-CINTRA et al., 1981; MILLER et al., 1977; RESNICK; MORGANE, 1984; BLATT et al., 1994; GALLER et al., 2005; MOKLER et al., 1999, 2003; MORGANE et al., 2002) e expressão de c-Fos no CPf de ratos desnutridos submetidos ao estresse (MOKLER et al., 2007).

Estudos clínicos indicam que crianças expostas à desnutrição pré-natal mostram alterações comportamentais que podem ser ainda observadas em etapas posteriores de desenvolvimento e na vida adulta. Estas alterações incluem problemas de atenção e hiperatividade (TDAH), aumento de agressividade e desadaptação social (GALLER; RAMSEY, 1989; LIU et al., 2004; GALLER et al., 2005, 2006). Ainda, a desnutrição pré-natal foi associada a um aumento no risco de desenvolver doenças psiquiátricas como depressão (SUSSER et al., 1996; NEUGEBAUER et al., 1999) e esquizofrenia (ST CLAIR et al., 2005).

Em síntese, existem dados experimentais e clínicos que indicam que a DPPN está associada a alterações em processos cognitivos ou condições psiquiátricas onde o córtex pré-frontal (CPf) desempenha uma atuação fundamental.

Ante estes dados e ante a evidente importância que o estudo das consequências da desnutrição em períodos iniciais da formação encefálica adquire, resulta pertinente analisar alguns parâmetros estruturais do CPf em modelos experimentais de DPPN.

Considerando que quadros de desnutrição em períodos iniciais do desenvolvimento estão associados a diversos níveis de comprometimento cognitivo e a um aumento no risco de posterior aparecimento dessas doenças, nós propomos este estudo para responder se algumas das alterações estruturais nelas observadas podem ser também encontradas em modelos experimentais de DPPN.

Ante a crescente importância que a neurofisiologia glial vem assumindo nos últimos anos (ARAQUE et al., 2003; PARRI; CRUNELLI, 2003; BENNETT et al., 2003; SANTELLO; VOLTERRA, 2009), decidimos realizar uma quantificação da população astrocitária, mediante a evidênciação da proteína ligante de cálcio S100B, expressa fundamentalmente nos corpos celulares dos astrócitos.

Estudos recentes sugerem que a densidade desta célula glial é afetada no sistema nervoso central (SNC) de ratos submetidos à restrição alimentar durante o período fetal (GRESSEN et al., 1997; FROTA-MENDONÇA et al., 2004), sendo a própria proteína S100B um biomarcador para algumas doenças psiquiátricas (STEINER et al., 2008; ALEKSOVSKA et al., 2014).

Os astrócitos influenciam a atividade e a sobrevivência dos neurônios graças à sua capacidade de controlar os componentes do meio extracelular, absorver excessos de neurotransmissores e sintetizar moléculas neuroativas. Considerando também que é cada vez mais evidente a participação dos astrócitos nos mecanismos sinápticos e de neurotransmissão, e que fatores tróficos liberados pelos astrócitos podem regular a diferenciação neuronal e a sinaptogênese (BLONDEL et al., 2000; SONG et al., 2002) não pode ser descartada a possibilidade que algumas das alterações cognitivas e doenças psiquiátricas associadas à DPPN estejam também relacionadas a alterações nessa população celular, motivo que nos leva a seu estudo no presente projeto.

2 Metodologia

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. O modelo de desnutrição proteica adotado seguiu o seguinte protocolo: Esse projeto foi aprovado pelo comitê de ética, 000738/2013.

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, Rhoster) 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, profundamente anestesiados 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).

Remoção dos encéfalos, pós-fixação, crioproteção, e técnicas histoquímicas e 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 dimetilsulfóxido (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 et al., 1986.

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

Os cortes foram recolhidos em costar contendo tampão fosfato, e separadas seis séries - resultando em distâncias de 300 µm entre cortes de uma mesma série e assim realizada a técnica imuno-histoquímica para S100B.

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-histoquímica para uma mesma técnica (incluindo os seis animais controle e os seis desnutridos no caso do grupo de 21 dias ou os seis nutridos e seis desnutridos do grupo de 60 dias) 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.

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 córtex pré-frontal 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, 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.

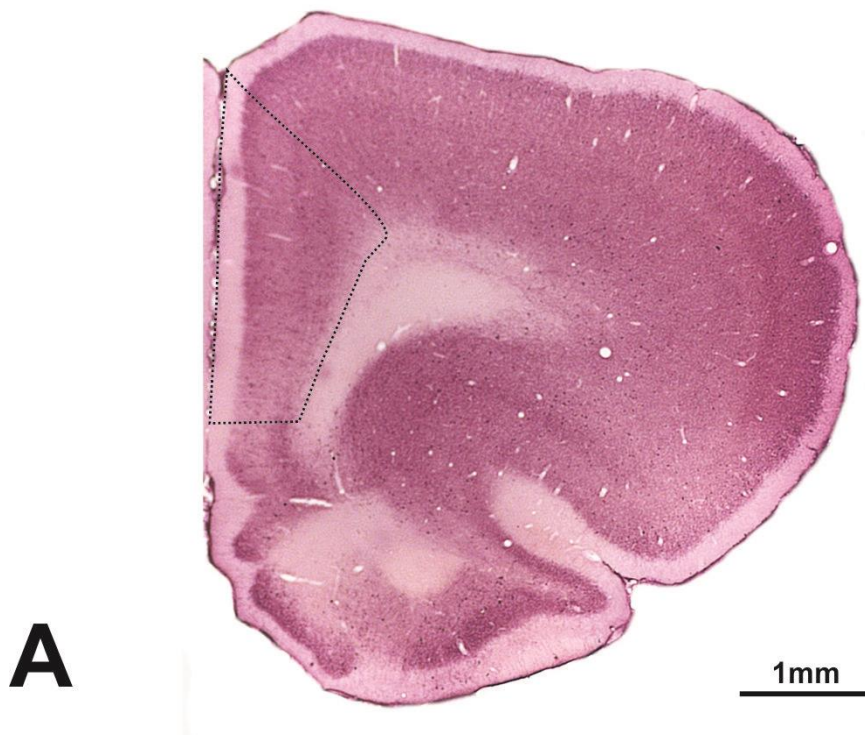
Provavelmente o único consenso é que uma região homóloga ao CPf observado em primatas pode ser localizada apenas na fase medial do lobo frontal. No atlas de Paxinos e Watson (2006), esta região inclui as áreas MO (medial orbital córtex), PrL (prelimbic cortex), IL (infralimbic cortex) e Cg1 (cingulate 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, ACAAd (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 incluir 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 (ver figura abaixo), 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.

Figura 1 - Corte frontal de hemiencéfalo de rato de 21 dias, mostrando a delimitação da Região de Interesse (ROI) utilizada neste estudo



A área pontilhada 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. Assim, a ROI inclui as áreas pré-frontais ACx, IL e PL, conforme parcelação de Krettek e Price (1977) e Perez-Cruz et al. (2007) e pode ser facilmente reproduzida utilizando referências do próprio corte.

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 polo frontal até o início da decussação do corpo caloso, gerando entre 6 a 8 cortes com intervalos de 6 para cada técnica e cada animal.

As caixas de contagem foram padronizadas em $100 \mu\text{m}^2$, e seu número em 15 em cada ROI, de forma a incluir um mínimo de 200 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 (técnicas que exigem recuperação de antígeno apresentam contração maior). 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)

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Foi utilizado o teste t de Student, não pareado, adotando um índice de significância $P < 0,05$.

3 Resultados

Dados ponderais

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.

Tabela 1 - Peso corporal de ratos nutridos e desnutridos na idade P21

	Peso corporal animais nutridos (em gramas)	Peso corporal animais desnutridos (em gramas)
Animal 1	49,70	26,56
Animal 2	60,13	24,72
Animal 3	67,55	27,52
Animal 4	64,01	17,84
Animal 5	60,60	16,82
Animal 6	60,07	15,63
Média ± Desvio padrão	60 ± 2,4	22 ± 2,2

Tabela 2 - Peso corporal de ratos nutridos e desnutridos na idade P60

	Peso corporal animais nutridos (em gramas)	Peso corporal animais desnutridos (em gramas)
Animal 1	332,90	35,10
Animal 2	334,40	40,20
Animal 3	328,04	58,40
Animal 4	322,90	45,19
Animal 5	331,18	45,77
Animal 6	326,02	44,80
Média ± Desvio padrão	329,2 ± 4,38	44,91 ± 7,76

Gráfico 1 - Representação gráfica dos dados relativos ao peso corporal dos animais nutridos (N) e desnutridos (D), com 21 e 60 dias de idade. Diferenças extremamente significativas ($P < 0,0001$) foram observadas entre os animais nutridos e desnutridos tanto na idade P21 como P60.

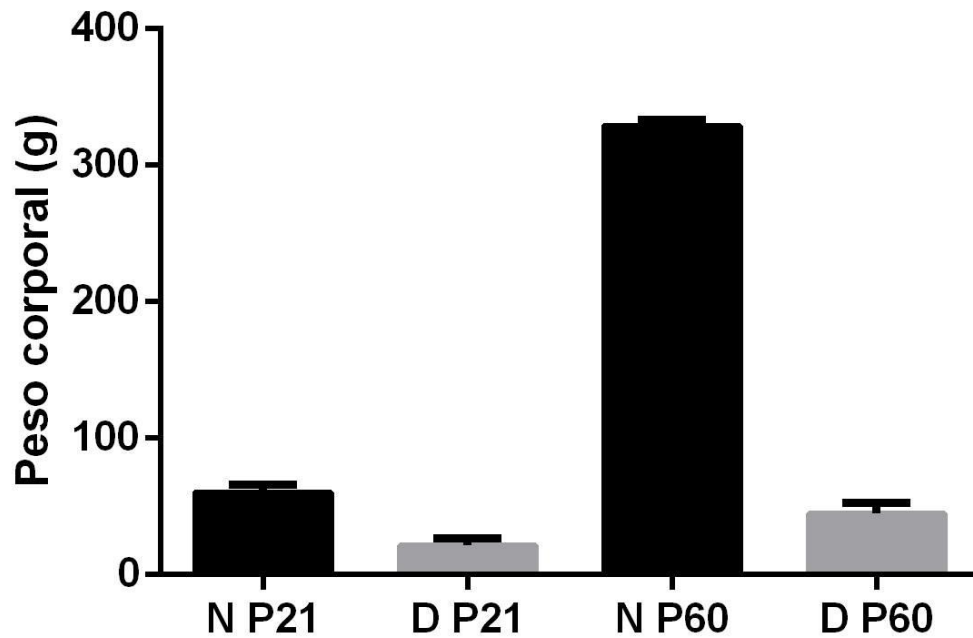


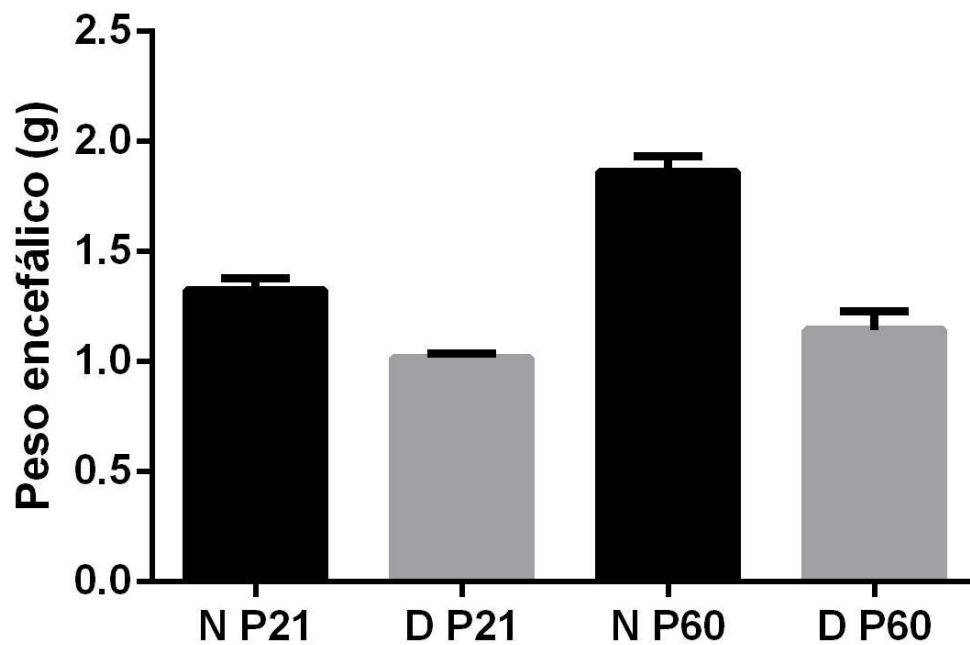
Tabela 3 - Peso encefálico de ratos nutridos e desnutridos na idade P21

	Peso encefálico de animais nutridos (em gramas)	Peso encefálico de animais desnutridos (em gramas)
Animal 1	1,27	1,02
Animal 2	1,28	1,03
Animal 3	1,30	1,03
Animal 4	1,41	1,03
Animal 5	1,35	1,02
Animal 6	1,35	0,98
Média ± Desvio padrão	1,3 ± 0,022	1,0 ± 0,0079

Tabela 4 - Peso encefálico de ratos nutridos e desnutridos na idade P60

	Peso encefálico de animais nutridos (em gramas)	Peso encefálico de animais desnutridos (em gramas)
Animal 1	1,80	1,15
Animal 2	1,99	1,07
Animal 3	1,80	1,20
Animal 4	1,89	1,24
Animal 5	1,87	1,19
Animal 6	1,83	1,02
Média $\pm$ Desvio padrão	1,86 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,08

Gráfico 2 - Representação gráfica dos dados relativos ao peso encefálico dos animais nutridos (N) e desnutridos (D), com 21 e 60 dias de idade. Foram observadas diferenças extremamente significativas ($P < 0,0001$) entre os animais nutridos e desnutridos tanto na idade P21 como P60.



Astrócitos

Aspecto morfológico

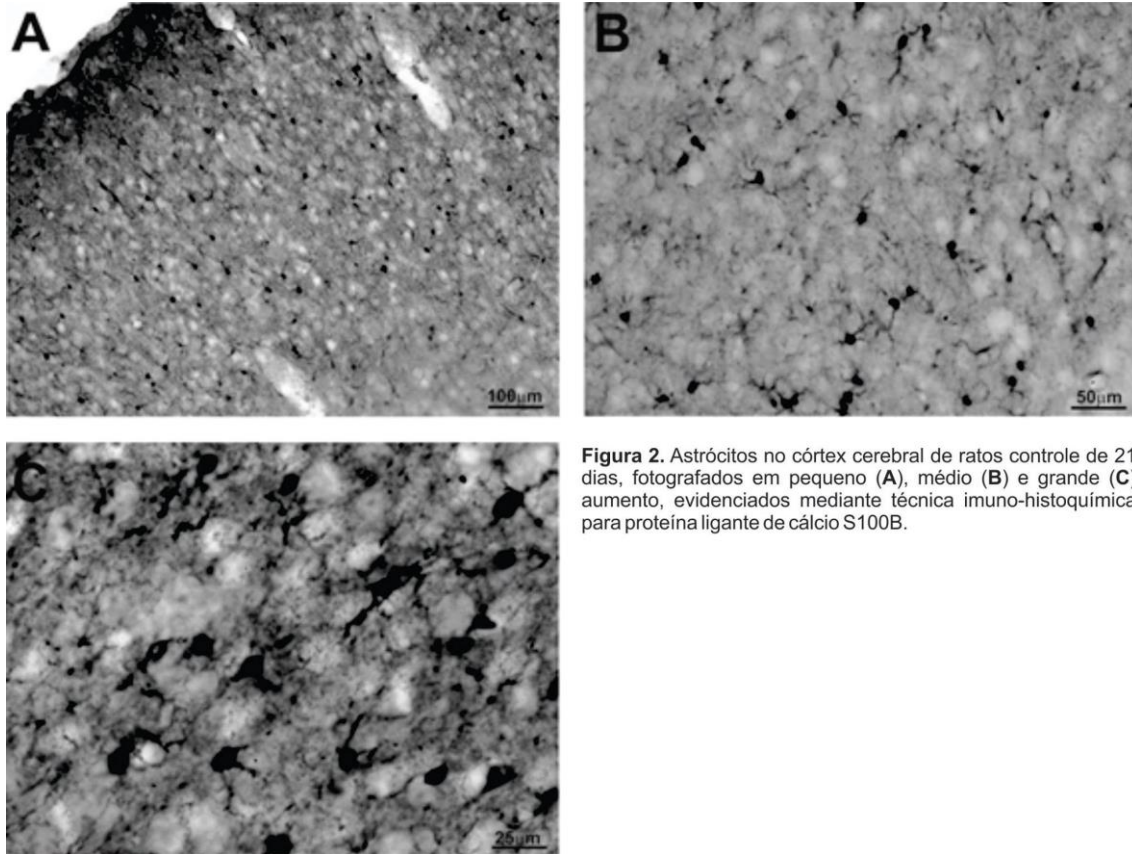


Figura 2. Astrócitos no córtex cerebral de ratos controle de 21 dias, fotografados em pequeno (A), médio (B) e grande (C) aumento, evidenciados mediante técnica imuno-histoquímica para proteína ligante de cálcio S100B.

Aspectos quantitativos

Nossos resultados mostram que a desnutrição proteica diminuiu significativamente o número de astrócitos no grupo de 21 dias, conforme pode ser observado nos dados estatísticos abaixo apresentados. Já aos 60 dias observamos uma normalização no grupo desnutrido, com o grupo nutrido apresentando o maior valor numérico, sem entretanto serem observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos

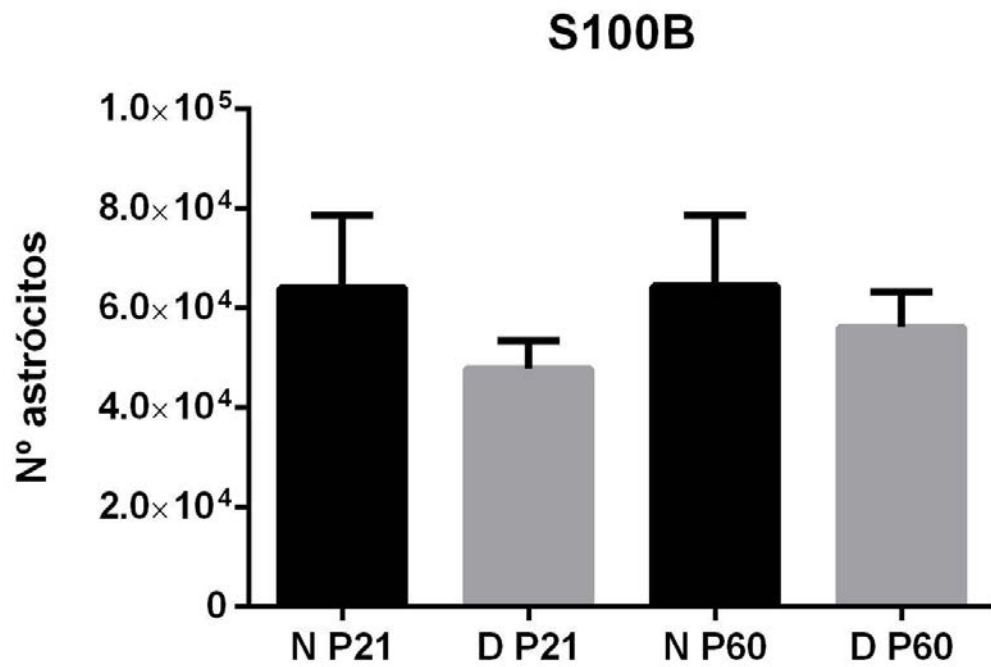
Tabela 5 - Número de astrócitos S100B+, grupo de 21 dias.

	S100B 21d Nutrido	S100B 21d Desnutrido
Animal 1	65824,	49719,
Animal 2	50189,	56168,
Animal 3	56676,	42916,
Animal 4	87749,	46114,
Animal 5	51527,	51313,
Animal 6	72996,	41227,
Média ± Desvio padrão	64160 ± 5911	47910 ± 2279

Tabela 6 - Número de astrócitos S100B+, grupo de 60 dias.

	S100B 60d Nutrido	S100B 60d Desnutrido
Animal 1	50643,	56007,
Animal 2	54035,	47144,
Animal 3	79217,	58037,
Animal 4	81641,	62809,
Animal 5	69429,	64383,
Animal 6	51920,	48712,
Média ± Desvio padrão	64480 ± 5758	56180 ± 2899

Gráfico 3 - Representação gráfica dos dados relativos ao número de astrócitos nos animais nutridos (N) e desnutridos (D). Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) apenas no grupo de 21 dias, com normalização estatística em P60.



4 Discussão

Nossos resultados ponderais confirmam a eficiência do modelo de desnutrição adotado no sentido de gerar alterações significativas no peso corporal e encefálico, tanto nos grupos de 21 e 60 dias, além de se assemelhar às reais condições de desnutrição que atinge parcela significativa da população mundial.

Aos 21 dias, os animais desnutridos apresentaram, em média, um peso corporal 74% inferior ao observado nos animais controle (Tabela e gráfico 1). Em relação ao peso encefálico, nos animais desnutridos este foi em média 24% inferior (Tabela 3 e gráfico 2). Já no grupo de 60 dias as diferenças no peso corporal foram mais dramáticas. Os animais desnutridos apresentaram um peso corporal correspondente a apenas 13% do observado nos animais nutridos (Tabela 2 e gráfico 1). Esta diferença não foi tão acentuada em relação ao observado no peso encefálico, onde nos animais desnutridos foi em média 39% inferior ao peso encefálico dos animais controle (Tabela 4 e gráfico 2).

A desnutrição atingindo o período gestacional, estendendo-se durante a amamentação (grupo P21) e até os 60 dias, apresentou resultados de alteração de peso corporal mais expressivos que os descritos em outros modelos. De fato, desnutrição proteica atingindo exclusivamente a fase gestacional produz déficits de peso corporal da ordem de 11% em P21 (CHEN et al., 1997) e 5% em P45 e (ALMEIDA et al., 1996). Curiosamente, Santucci et al. (1994) observaram que quando a desnutrição proteica é implementada apenas durante a amamentação a redução de peso corporal em P21 é mais acentuada (60%; para revisão, ver ALAMY e BENGELLOUN, 2012). Este dado reforça o conceito que, na fase intrauterina, o encéfalo é beneficiado por fatores de neuroproteção (RESS et al., 2011).

É importante ressaltar que o modelo de desnutrição proteica adotado neste estudo atinge todos os períodos críticos de gênese e migração celular, incluindo os períodos de gliogênese, neurogênese e mielinização, os quais se iniciam no período embrionário e se estendem às primeiras semanas pós-natais (para revisão, ver MORGANE et al., 2002). Como estes períodos seguem uma sequência bastante precisa, os resultados poderiam ser diferentes se a carência nutricional fosse temporalmente seletiva.

Nossos resultados indicam que a desnutrição proteica diminuiu significativamente o número de astrócitos S100B positivos (S100B+) no grupo de 21 dias (Tabela 5 e gráfico 3). Já aos 60 dias os animais desnutridos continuaram a apresentar um número menor de astrócitos quando comparados com os animais nutridos, embora essas diferenças não tenham sido significativas desde o ponto de vista estatístico (Tabela 6 e gráfico 3).

Astrócitos representam uma população celular heterogênea, desempenhando funções relevantes na fisiologia, desenvolvimento e patologia cerebral. Eles participam dos processos de sinaptogênese e apramento dendrítico, assim como nos processos de migração neuronal durante a neurogênese. Contribuem para a formação da barreira hematoencefálica, fornecem suporte estrutural e metabólico aos neurônios e, conforme verificado mais recentemente, modulam a transmissão sináptica e o fluxo de informação (MALLAMACI, 2013). Têm também uma participação fundamental nos processos de reparo e cicatrização durante processos patológicos e traumáticos (astrocitose; FREEMAN, 2010).

Estudos sobre a geração, proliferação e migração astrocitária indicam que os astrócitos que povoam o córtex cerebral provêm de duas origens. A primeira leva migratória provem da glia radial da zona ventricular (ZV) e de progenitores originados na zona sub-ventricular (ZSV). Esta população apresenta picos de proliferação e migração próximo ao nascimento (entre E14 e P0) diminuindo drasticamente a partir do desmame (P21; MARSHALL et al., 2003). Estudos recentes entretanto indicam que esta leva originada em ZV e ZSV corresponde apenas a 25% dos astrócitos maduros do córtex cerebral adulto. Os restantes 75% parecem corresponder a astrócitos originados localmente por divisão simétrica de astrócitos já diferenciados (astrocyte-like dividing cells, astrolike-D cells; GE et al., 2013). Assim, a queda no número de astrócitos que observamos nos animais desnutridos em P21 parece estar mais relacionada com alterações ocorridas no processo migratório, afetando as populações originadas na ZV e ZSV, as primeiras a alcançar o manto cortical. Estes dados coincidem com as observações de Gressens et al. (1997) que observaram que a desnutrição proteica nas primeiras duas semanas de gestação provocou um atraso de 15 dias no aparecimento e maturação de células GFAP positivas em várias regiões cerebrais do rato, incluindo o isocórtex.

Em nosso estudo constatamos que em P60, os animais que tinham sofrido desnutrição (grupos desnutrido) tiveram entre P21 e P60 uma normalização, não sendo mais observadas diferenças estatísticas entre animais nutridos e desnutridos (embora o número no grupo desnutrido tenha continuado a ser inferior). Este aumento parece refletir uma resposta mitótica da população astrocitária residente no córtex cerebral, já que a migração de progenitores desde ZV e ZSV é mínima a partir de P21 (FREEMAN, 2010).

Esta recuperação também coincide com os resultados já citados de Gressens et al. (1997). Já Feoli et al. (2008), em um modelo de desnutrição proteica semelhante ao adotado neste estudo, observaram um aumento no conteúdo de GFAP e S100B no córtex cerebral em P2. Observaram também que a dieta não alterou o desenvolvimento pós-natal desses marcadores. De acordo com os autores, o aumento observado em P2 poderia ser consequência da maturação celular e não de um aumento na população de astrócitos em períodos pós-natais. Os autores não observaram diferenças significativas no conteúdo de S100B em P15 e P60, mostrando, como em nossos resultados, uma normalização nestas idades.

Frota-Mendonça et al. (2004) observaram que a desnutrição pré-natal levou a uma diminuição no número de astrócitos GFAP positivos no núcleo supraquiasmático e na área pré-óptica medial no grupo P30-33 (semelhante aos nossos resultados), mas esta diminuição continuou a ser significativa nos períodos P60-63, ou seja, sem a recuperação observada em nosso estudo. Estas discrepâncias podem estar relacionadas com especificidades das regiões estudadas, com o método de contagem -já que no trabalho de Frota-Mendonça et al. não foram usadas técnicas estereológica-, ou é possível que as técnicas imuno-histoquímicas para evidênciação de S100B e GFAP estejam na realidade detectando diferentes populações astrocitárias, possibilidade também apontada no estudo de Feoli et al. (2008).

Nesse sentido, Emsley e Macklis (2006), baseados nas características observadas mediante os três principais métodos de marcação (imuno-histoquímica para GFAP-GF, GFAP e S100B) dividiram os astrócitos em nove diferentes populações: tanicitos, células 'radiais', glia de Bergmann, astrócitos protoplasmáticos, astrócitos fibrosos, glia velada, glia marginal, glia perivascular e glia endopendimial. De acordo com estes autores, dentro de uma determinada

região encefálica podem coexistir diversas populações, e a densidade astrocitária pode variar num fator de 1000 dependendo da estrutura analisada.

Paralelamente, fundamentados na análise da expressão gênica, Rusnakova et al. (2013) identificaram ainda três diferentes populações astrocitárias no córtex cerebral de camundongos nas idades compreendidas entre P10 e P50. A primeira subpopulação, formada fundamentalmente por glia imatura em P10 foi caracterizada por uma intensa atividade transcricional de todos os 46 genes estudados. A segunda subpopulação, abundante fundamentalmente em P20 foi caracterizada por baixos níveis de transcrição gênica, enquanto que a terceira subpopulação é composta por astrócitos maduros fundamentalmente observados entre P30 e P50.

Neste mesmo estudo, os autores observaram que a expressão dos marcadores mais comumente utilizados para a identificação de astrócitos, S100B e GFAP, apresenta níveis bem diferenciados. Por exemplo a expressão de GFAP para os períodos P10, 20, 30 e 50 foi observada em, respectivamente, 8, 13, 27 e 8% das células marcadas. Já para as mesmas idades a expressão de S100B correspondeu a 80, 48, 62 e 64% das células marcadas.

Estas diferenças exigem muita cautela na hora de comparar estudos que analisam a população de astrócitos que utilizem diferentes metodologias, e limitar os resultados à população astrocitária específica. Conforme enfatizado por Matyash e Kettenmann (2010), astrócitos representam uma população de células muito heterogênea, com diferentes morfologias e propriedades fisiológicas, não existindo um marcador que evidencie todas as populações.

Em nosso estudo também não podemos avaliar se a aparente recuperação observada nos animais desnutridos entre P21 e P60 obedece a mecanismos compensatórios relacionados com a plasticidade cortical, ou a uma resposta às alterações metabólicas causadas pela desnutrição.

A proteína ligante de cálcio S100B é expressa em astrócitos (e outras populações celulares), estimulando a proliferação e migração celular e inibindo a apoptose e a diferenciação, ativando assim astrócitos (astroglíose) durante episódios de lesão cerebral e processos degenerativos (Donato et al., 2013). Griffin et al. (1995) observaram que astrócitos reativos

aumentam sua síntese de S100B, o que manifesta a participação desta proteína nos processos de cicatrização e reparo dentro do SNC. Paralelamente, após lesão no córtex occipital de ratos, Cerutti e Chadi (2000) observaram um aumento no número de astrócitos S100B+ não apenas na região lesada, mas em várias estruturas da via visual, o que reforça a participação desta proteína nos processos de cicatrização e reparo tecidual. Assim, cabe a possibilidade que o aumento no número de astrócitos S100B+ que observamos nos animais desnutridos no grupo P60 do nosso estudo obedeça a um aumento na síntese dessa proteína como resposta à agressão metabólica representada pela desnutrição.

É possível também que o que observamos seja apenas uma normalização desse parâmetro, o que não implica que esta recuperação previna eventuais sequelas no futuro. O aparecimento tardio de sequelas após a exposição a agentes potencialmente nocivos durante as fases críticas de desenvolvimento cerebral –mesmo não existindo a posterior exposição ao agente- tem sido registrado em estudos clínicos e experimentais (para revisão, ver RISE e BARONE, 2000).

O aparecimento tardio de alterações morfológicas e/ou funcionais pode se tornar evidente em virtude de, ao menos, duas situações. Na primeira, a ontogenia de uma função cognitiva ou comportamental específica pode ocorrer tardiamente no desenvolvimento do animal, sendo que só nesse momento o dano ocorrido nas fases iniciais de desenvolvimento se torna perceptível. Neste sentido, estudos epidemiológicos indicam que quadros de desnutrição pré- e perinatal em humanos aumentam a incidência de algumas doenças psiquiátricas como esquizofrenia a partir da adolescência (SUSSER et al., 1996; NEUGEBAUER et al., 1999; ST CLAIR et al., 2005).

Por outra parte, alterações anatômicas ou funcionais causadas precocemente podem ser mascaradas mediante mecanismos compensatórios e de plasticidade. Com o envelhecimento, quando estes mecanismos já não são tão eficientes, estas alterações podem reaparecer levando ao surgimento de patologias. Este fenômeno tem sido demonstrado em modelos experimentais com roedores (WALLACE et al., 1972) e primatas (RICE, 1989), e foi verificado em populações humanas expostas a contaminantes como o metil-mercúrio, como nos episódios acontecidos em Japão na década de 1970 e relacionados com a doença de Minamata (IGATA et al., 1975).

5 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.
- b) Foi observada uma diminuição significativa no número de astrócitos S100B+ nos animais desnutridos na idade P21, com normalização dos parâmetros numéricos em P60.

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.
- ALEKSOVSKA, K. et al. Systematic Review and meta-analysis of circulating s100b blood levels in schizophrenia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e106342, 2014.
- ALMEIDA, S. S.; TONKISS, J.; GALLER, J. R. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neurosci. Biobehav. R.**, v. 20, p. 389–402, 1996.
- ANDRADE, J. P.; LUKOYANOV, N. V.; PAULA-BARBOSA, M. M. Chronic food restriction is associated with subtle dendritic alterations in granule cells of the rat hippocampal formation. **Hippocampus**, v. 12, p. 149-64, 2002.
- ARAQUE, A. et al. An astrocyte bridge from synapse to blood flow. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Nat. Neurosci.**, v. 6, p. 5-6, 2003.
- 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.
- BENNETT, M. V. et al. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. **Trends. Neurosci.**, v. 26, p. 610-700, 2003.
- BLATT, G. J. et al. Prenatal protein malnutrition effects on the serotonergic system in the hippocampal formation: an immunocytochemical, ligand binding, and neurochemical study. **Brain. Res. Bull.**, v. 34, n. 5, p. 507-18, 1994.
- BLONDEL, O. et al. A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 8012-20, 2000.
- BROSDA, J.; DIETZ, F.; KOCHA, M. Impairment of cognitive performance after reelin knockdown in the medial prefrontal cortex of pubertal or adult rats. **Neurobiol. Dis.**, v. 44, n. 2, p. 239-47, 2011.

CARUNCHO, H. J. et al. A GABA, reelin, and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. **Crit. Rev. Neurobiol.**, v. 16, n. 1-2, p. 25-32, 2004. Review.

CASSIDY, A. W. et al. Developmental emergence of reelin deficits in the prefrontal cortex of wistar rats reared in social isolation. **Neuroscience.**, v. 166, p. 377–385, 2010.

CERUTTI, S.M.; CHADI, G. S100B immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex. **Cell. Biol. Int.**, v. 24, n. 1, p. 35-49, 2000.

CHEN, J.C. et al. Postnatal changes of brain monoamine levels in prenatally malnourished and control rats. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 15, n. 2, p. 257–263, 1997.

CLARK, G. M. et al. The effect of prenatal malnutrition on dimensions of cerebral cortex. **Brain. Res.**, v. 17, n. 54, p. 397-402, 1973.

CONDE, F. et al. Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. **J. Comp. Neurol.**, v. 341, p. 95 –116, 1994.

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.

DE ONIS, M. et al. Estimates of global prevalence of childhood underweight in 1990 and 2015. **JAMA.**, v. 291, p. 2600-6, 2004.

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. The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. **Brain. Res.**, v. 221, p. 243-55, 1981.

DONATO, R. et al. Functions of S100B proteins. **Curr. Mol. Med.**, v. 13, n. 1, p. 24-57, 2013.

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

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.

FREEMAN, M. Specification and morphogenesis of astrocytes. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 774-778, 2010.

FROTSCHER, M. Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. **Trends. Neurosci.**, v. 33, p. 407-14, 2010. Review.

GALLER, J. R. et al. Behavioral effects of childhood malnutrition. **Am. J. Psychiatry.**, v. 162, p. 1760–1761, 2005.

GALLER, J. R. et al. The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development: II. Classroom behavior. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psych.**, v. 22, p. 16–22, 2006.

GE, W. P. et al. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. **Nature.**, v. 484, n.7394, p. 376-80, 2012.

GLASER, E. M.; WILSON, P. D. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. **J. Microsc.**, v. 192, p. 163-71, 1998.

GOLAN, H. M. et al. Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia. **Neuropharmacology.**, v. 57, p. 511-522, 2009.

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.

GUIDOTTI, A.; PESOLD, C.; COSTA, E. New neurochemical markers for psychosis: a working hypothesis of their operation. **Neurochem. Res.**, v. 25, p. 1207-18, 2000.

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.

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.

LAI, M.; LEWIS, P. D. Effects of undernutrition on myelination in rat corpus callosum. **J Comp Neurol.**, v. 193, p. 973-82, 1980.

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.

LEWIS, D.; LEVITT, P. schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 25, p. 409–32, 2002.

LIM, K. O. et al. Cortical gray matter volume deficit in patients with first episode schizophrenia. **Am. J. Psychiatry.**, v. 153, p. 1548–1553, 1996.

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.

LIU, J. et al. Malnutrition at age 3 years and externalizing behavior problems at ages 8, 11, and 17 years. **Am. J. Psychiatry.**, v. 161, p. 2005–2013, 2004.

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.

MALLAMACI, A. Developmental control of cortico-cerebral astrogenesis. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 57, p. 689-706 , 2013.

MARSHALL, C. A.; SUZUKI, S. O.; GOLDMAN, J. E. Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: who are they, where did they come from, and where are they going? **Glia.**, v. 43, n. 1, p. 52-61, 2003.

MATYASH, V.; KETTENMANN, H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. **Brain. Res. Ver.**, v. 63, n. 1-2, p. 2-10, 2009.

MENDONÇA, J. E. et al. GFAP expression in astrocytes of suprachiasmatic nucleus and medial preoptic area are differentially affected by malnutrition during rat brain development. **Nutr. Neurosci.**, v. 7, n. 4, p. 223-34, 2004.

MILLER, M. et al. Effects of developmental protein malnutrition on tryptophan utilization in brain and peripheral tissues. **Brain. Res. Bull.**, v. 2, p. 347–353, 1977.

MOKLER, D. J. et al. Effects of median raphé electrical stimulation on serotonin release in the dorsal hippocampal formation of prenatally malnourished rats. **Brain. Res.**, v. 838, p. 95–103, 1999.

MOKLER, D. J. et al. Stress-induced changes in extracellular dopamine and serotonin in the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus of prenatally malnourished rats. **Brain. Res.**, v. 1148, p. 226-233, 2007.

MOKLER, D. J.; GALLER, J. R.; MORGANE, P. J. Modulation of 5-HT release in the hippocampus of 30-day-old rats exposed in utero to protein malnutrition. **Dev. Brain. Res.**, v. 142, p. 203–208, 2003.

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.

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.

PARRI, R.; CRUNELLI, V. An astrocyte bridge from synapse to blood flow. **Nat. Neurosci.**, v. 6, n. 1, p. 5-6, 2003.

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.

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.

RESNICK, O.; MORGANE, P. J. Ontogeny of the levels of serotonin in various parts of the brain in severely protein malnourished rats. **Brain. Res.**, v. 303, p. 163–170, 1984.

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.

ROSENE, D. L.; ROY, N. J.; DAWIS, B. J. A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 34, p. 1301–1315, 1986.

RUSNAKOVA, V. et al. Heterogeneity of astrocytes: from development to injury – single cell gene expression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e69734, 2013.

SALAS, M.; DÍAZ, S.; NIETO, A. Effects of neonatal food deprivation on cortical spines and dendritic development of the rat. **Brain. Res.**, v. 73, p. 139-44, 1974.

SANDRA REES, S.; HARDING, R.; WALKER, D. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 29, n. 6, p. 551–563, 2011.

SANTELLO, M.; VOLTERRA, A. Synaptic modulation by astrocytes via Ca²⁺-dependent glutamate release. **Neuroscience.**, v. 158, p. 253-9, 2009.

SANTUCCI, L. B. et al. Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Be.**, v. 49, n. 2, p. 393–398, 1994.

SELEMON, L. D.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. The Reduced Neuropil Hypothesis: A Circuit Based Model of Schizophrenia. **Biol. Psychiat.**, v. 45, p. 17–25, 1999.

SELEMON, L. D.; RAJKOWSKA, G.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex: Amorphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. **Arch. Gen. Psychiat.**, v. 52, p. 805–818, 1995.

SELEMON, L. D.; RAJKOWSKA, G.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Elevated neuronal density in prefrontal area 46 in brains from schizophrenic patients: Application of a 3-dimensional, stereologic counting method. **J. Comp. Neurol.**, v. 392, p. 402–412, 1998.

SONG, H.; STEVENS, C. F.; GAGE, F.H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. **Nature.**, v. 417, p. 39–44, 2002.

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.

STEINERA, J. et al. S100B-immunopositive glia is elevated in paranoid as compared to residual schizophrenia: A morphometric study. **J. Psychiat. Res.**, v. 42, p. 868–876, 2008.

SULLIVAN, E. V. et al. Cognitive and motor impairments are related to gray matter volume deficits in schizophrenia. **Biol. Psychiat.**, v. 39, p. 234–240, 1996.

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

TISSIR, F.; GOFFINET, A. M. Reelin and brain development. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 4, p. 496-505, 2003.

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

VIAU, V. et al. Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. **Endocrinology**, v. 146, p. 137-46, 2005.

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.

WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **J. Nutr.**, v. 89, p. 300-6, 1966.

WOO, T. U. et al. A subclass of prefrontal gama-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 5341–5346, 1988.

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.

World Health Organization. **Millennium Development Goals**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/millennium_development_goals/en/index.html>. Acesso em: 20 nov. 2013.

YAMANO, T. et al. Effect of maternal malnutrition on the developing cerebral cortex of mouse embryo: an electron microscopic study. **Exp. Neurol.**, v. 68, p. 228-39, 1980.

ZAMENHOF, S.; VAN MARTHENS, E.; MARGOLIS, F. L. DNA (cell number) and protein in neonatal brain: alteration by maternal dietary protein restriction. **Science.**, v. 160, p. 322-3, 1968.

ZERLIN, M.; LEVISON, S. W.; GOLDMAN, J. E. Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of subventricular zone cells in the postnatal rat forebrain. **J. Neurosci.**; v. 15, n. 11, p. 7238-49, 1995.