



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

---

**ORGANIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL NO CÉREBRO DO RATO  
DESNUTRIDO: ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS  
NADPH-diaforase POSITIVOS NO CÓRTEX VISUAL PRIMÁRIO DE RATOS  
RECÉM-DESMAMADOS, SUBMETIDOS  
À DESNUTRIÇÃO PERINATAL**

---

**Juliana Maria Carrazzone Borba**

**RECIFE  
1998**

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

ORGANIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL NO CÉREBRO DO RATO DESNUTRIDO:  
ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS NADPH-diaforase  
POSITIVOS NO CÓRTEX VISUAL PRIMÁRIO DE RATOS  
RECÉM-DESMAMADOS, SUBMETIDOS  
À DESNUTRIÇÃO PERINATAL

**Juliana Maria Carrazzone Borba**

Tese de mestrado apresentada ao Departamento de  
Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal de Pernambuco para obtenção  
do grau de Mestre em Nutrição.

## **ORIENTADOR**

**Dr. Cristovam Wanderley Picanço-Diniz**

Professor Adjunto do Departamento de Fisiologia,  
Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Pará

## **CO-ORIENTADOR**

**Dr. Raul Manhães de Castro**

Professor Adjunto do Departamento de Nutrição,  
Centro de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal de Pernambuco

**RECIFE  
1998**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco e no Laboratório de Biofísica Celular, do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Pará, sob a orientação do Professor Cristovam Wanderley Picanço-Diniz e co-orientação do Professor Raul Manhães de Castro. Contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Governo do Estado de Pernambuco (FACEPE).

*“ Muitas vezes, a causa principal da pobreza em ciência, é a riqueza presumida. A finalidade da ciência não é abrir a porta ao saber infinito. Mas colocar um limite à infinitude do erro.”*

***Bertold Brecht,***  
***in Galileu Galilei***

*Aos meus pais, Mário e Claudete,  
um porto seguro na minha vida.*

# AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por colocar na minha vida pessoas iluminadas, com as quais tenho tido muito o que aprender.

Aos meus irmãos, **Mário e Álvaro**, pelo voto de confiança.

Ao professor, orientador **Cristovam Wanderley Picanço-Diniz**, pela oportunidade deste trabalho. Fica aqui a minha mais profunda gratidão, admiração e respeito.

Ao professor, co-orientador **Raul Manhães de Castro**, pelas críticas construtivas sempre muito oportunas no decorrer desta jornada.

A **Marília Araújo**, minha grande amiga e companheira de trabalho, a quem tanto admiro pela integridade do seu caráter.

Ao **Prof. José Eulálio Cabral-Filho**, pela orientação e incentivo, ainda como estagiária, em seu laboratório.

A **Cristiana Menezes** e **Christiane Meirelles**, pelo incentivo no início da minha vida científica. Vocês se tornaram exemplos de profissionais e sobretudo grandes amigas.

Aos estagiários: **Ângela, Elzir, Deirdre** pelo apoio nos cuidados com os animais, na confecção das dietas e na montagem das lâminas.

A **Lúcia Maria Pires Ferreira**, pela eterna disponibilidade em ajudar sempre que solicitada.

Aos amigos da **família Pinho de Sá**, pela hospedagem calorosa na ocasião de minha ida repentina a Belém do Pará, minha eterna gratidão.

Aos amigos da **família Araújo**, pela gentileza de me receber tão carinhosamente durante minha longa estada em Belém, minha eterna gratidão.

As amigas da XV Turma do Mestrado, principalmente, **Marília, Maria das Graças, Maria da Conceição, Mônica, Taciana e ainda Vera, Olívio, Catarina, Cecília, Magda, ....** vocês tornaram meus dias mais leves quando algo não ia muito bem.

As amigas **Jailma, Surama e Ana Paula**, pela eterna disponibilidade em ajudar no que fosse preciso.

A todos os funcionários do Departamento de Nutrição, em especial a **Fernanda Almeida, Ana França, Dona Damiana, Necy, Hamilton, Sr. José Paulino, Laércio, Artur e Roberto**, pelas inúmeras contribuições.

A **Dona Ana Norberto** pela amizade e auxílio na confecção das misturas minerais.

A **Roni**, que teve um papel fundamental na confecção de várias provas do material fotográfico.

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de estudo.

A **FACEPE**, pela bolsa de auxílio finalização de tese.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira participaram comigo na realização dessa dissertação.

# **1. INTRODUÇÃO**



## 1.1- DESNUTRIÇÃO E SISTEMA NERVOSO

Nesta década, estimou-se que no mundo, aproximadamente 195 milhões de crianças menores de 5 anos estivessem desnutridas (Brown & Pollitt, 1996). A gravidade desta situação torna-se mais evidente nos países em desenvolvimento, onde a combinação de fatores sociais, políticos e econômicos são determinantes de uma trágica realidade.

É inquestionável o papel da nutrição adequada para o crescimento e desenvolvimento do ser humano. Os déficits nutricionais, seja pela falta e/ou diminuição de certos macro ou micronutrientes na alimentação, levam a quadros de desnutrição. De acordo com o tipo, a severidade, a duração e o período da vida em que incide, a desnutrição pode promover efeitos danosos e às vezes irreversíveis ao organismo (Morgane et al., 1992).

Para o sistema nervoso, os efeitos da desnutrição são muito mais severos quando ela coincide com o **período de crescimento rápido do cérebro**. Esta denominação, não está simplesmente relacionada com o rápido aumento do peso cerebral, como havia sugerido Dobbing (1970), mas sim com vários períodos em que eventos como a neurogênese, a gliogênese e a migração neuronal, atingem a velocidade máxima em cada área cerebral (Morgane et al., 1993). Por ser uma fase na qual o cérebro se encontra mais vulnerável às agressões, inclusive à desnutrição (Dobbing, 1968), essa fase também é denominada de **período crítico do desenvolvimento**.

Embora a seqüência de eventos ontogenéticos seja semelhante, a época de ocorrência do período crítico do desenvolvimento, varia de acordo com cada espécie. No homem, inicia-se no período pré-natal (último trimestre de gestação) e continua até os 18 meses de vida pós-natal. No rato (animal experimental mais freqüentemente usado para o estudo da desnutrição), este período corresponde às 3 primeiras semanas após o nascimento (Dobbing, 1972).

De um modo geral, tem sido mostrado experimentalmente que a desnutrição *per se* é capaz de promover alterações neuroanatômicas (Brock & Prasad, 1992; Díaz-Cintra et al., 1990; Dobbing et al., 1971; García-Ruiz et al., 1993; Leuba & Rabinowicz, 1979(a); Leuba & Rabinowicz, 1979 (b); Resnick et al., 1979), bioquímicas (Agarwal et al., 1981; Chen et al., 1992; Marín et al., 1995; Menedez-Patterson et al., 1987; Rabin et al., 1994; Resnick et al., 1979) e eletrofisiológicas (Austin et al., 1986; Guedes et al., 1992; Quirk et al., 1995) durante o desenvolvimento do sistema nervoso.

Para se obter um modelo experimental de desnutrição em animais, várias técnicas podem ser usadas, dentre elas as de manipulação da dieta, tais como: redução do teor de proteínas (Austin et al., 1986; Azzolin et al., 1991; Brock & Prasad, 1992; Colombo et al., 1992), redução protéico-calórica (Dastur et al., 1977; Ekhert et al., 1976; Marín et al., 1995; Teodósio et al., 1981) ou ainda redução de nutrientes específicos (Golub et al., 1983; Root et al., 1988; Xie & Smart, 1991).

Os resultados dos trabalhos anteriormente citados empregando estas técnicas, evidenciaram que a maioria dos nutrientes participavam, de alguma forma, do processo de maturação do cérebro. Entretanto, as proteínas pareceram ser o componente mais crítico para o desenvolvimento das estruturas e funções neurais (Morgane, 1993).

As pesquisas desenvolvidas utilizando animais de laboratório são essenciais para se estimar os efeitos potencialmente prejudiciais da desnutrição. Através delas, podem ser estabelecidas relações causais entre a desnutrição precoce e alterações de estruturas no cérebro, com possíveis conseqüências comportamentais e cognitivas (Levitsky & Strupp, 1995).

Estudos neuroanatômicos de regiões encefálicas específicas, em animais submetidos à desnutrição precoce, têm confirmado as suspeitas de Dobbing (1968) e de Winick & Noble (1966) sobre a vulnerabilidade do sistema nervoso. Além disso, têm fornecido maiores evidências de alterações estruturais severas (Morgane et al 1978; Morgane, 1992). Assim, em ratos, estruturas encefálicas que se desenvolvem após o nascimento, como o cérebro, o hipocampo e o cerebelo, estão mais susceptíveis às alterações, que podem persistir por toda a vida (Levitsky & Strupp, 1995).

Trabalhos experimentais mostram que a privação nutricional, durante o desenvolvimento cerebral, promove alterações de parâmetros como: redução dos pesos corporal e encefálico (Coutinho, 1976; Díaz-Cintra et al., 1990; Fernández et al., 1993; Monteiro 1995; Teodósio et al., 1990); redução do

volume (Bedi & Bhide, 1988; Morgane, 1978) e da espessura do córtex cerebral (Cragg, 1972; Dobbing et al., 1971); aumento do número de espinhas dendríticas em neurônios piramidais do córtex visual (Díaz-Cintra et al., 1990); redução da espessura dos processos dendríticos, do número e da densidade de espinhas dendríticas no córtex frontal e occipital (Salas et al., 1974); e aumento da densidade de espinhas dendríticas no striatum e no córtex entorrinal de ratos (Brock & Prasad, 1992).

No início do século, estudos realizados por Sugita (1918) e depois confirmados por Leuba & Rabinowicz (1979a), revelaram que o número de neurônios corticais parece não sofrer com as agressões nutricionais. Segundo Bedi & Warren (1983) e Leuba & Rabinowicz (1979a), diante da agressão nutricional, os neurônios corticais são poupados o que poderia refletir um mecanismo de resistência celular. Entretanto, este fenômeno é considerado patológico e reflete um agrupamento anormal de células, que vem sendo denominado na literatura de "empacotamento" celular (do inglês, "cell packing"). Esta hipótese do "empacotamento" celular é reforçada pela evidência de redução da mielina no espaço intercelular, bem como das dimensões neuronais (Levitsk & Strupp, 1995; Morgane et al., 1978).

Os achados acima mencionados, indicam que os efeitos da agressão nutricional sobre estruturas neurais no cérebro, têm merecido considerável atenção. Contudo, ainda não existem estudos sobre os efeitos da desnutrição em determinadas populações de neurônios resistentes a certos tipos de agressão.

Uma população de neurônios visivelmente resistente aos efeitos tóxicos de aminoácidos excitatórios (Beal et al., 1986; Koh & Choi, 1988) e da hipóxia (Uemura et al., 1990), bem como aos efeitos neurodegenerativos das doenças de Huntington (Ferrante et al., 1985) e de Alzheimer (Kowal & Beal, 1988), é aquela que expressa a enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-diaforase (NADPH-diaforase).

Atualmente, está demonstrado que a NADPH-diaforase está colocalizada com a Sintase do Óxido Nítrico (SON) e por isto vem sendo vastamente utilizada como um marcador para estruturas neuronais que contêm esta enzima (Bredt et al., 1990; Garthwaite, 1991; Hope e al., 1991; Valtchanoff, 1993). A SON é responsável pela síntese do óxido Nítrico (ON), um gás difusível que parece exercer o papel de um mensageiro molecular importante para o desenvolvimento e para a plasticidade neural (Bredt et al., 1990; Garthwaite, 1991; Snyder 1992). A plasticidade neural, capacidade que as células nervosas apresentam em responder a algum tipo de manipulação principalmente durante o desenvolvimento, é um fator extremamente afetado pela agressão nutricional. Sendo assim, torna-se oportuno fazer um breve histórico a respeito do ON e de seu papel nas funções neurais.

## **1.2- ÓXIDO NÍTRICO E SISTEMA NERVOSO**

Na atmosfera, o ON é formado a partir do oxigênio e do nitrogênio. Biologicamente, sua síntese ocorre em uma reação catalizada pela enzima Sintase do Óxido Nítrico (SON) entre o oxigênio molecular ( $O_2$ ) e a L-

arginina, em células e tecidos de mamíferos, bem como de muitas espécies primitivas (Knowles et al., 1989).

O ON foi inicialmente caracterizado como um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Furchgott & Zawadzki (1980) observaram que ação da acetilcolina nos receptores localizados nas células endoteliais, resultava na liberação de uma pequena molécula, que se difundia para a musculatura lisa adjacente promovendo vasodilatação. Este efeito era abolido quando a camada endotelial era removida, mas podia ser restaurado pela reaplicação de células endoteliais à camada de músculos lisos, indicando que uma molécula difusível originada no endotélio mediava o relaxamento da musculatura. Alguns anos depois, foi comprovado que os macrófagos também apresentavam essa mesma capacidade de síntese ao serem estimulados por endotoxinas (Marletta et al., 1988).

A primeira evidência de que o ON atuava como um mensageiro neuronal, partiu de um estudo de Garthwaite et al. (1988) em células granulosas cerebelares. Estes autores demonstraram, *in vitro*, que a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), promovia aumento dos níveis intracelulares de GMPc (um segundo mensageiro para neurotransmissores e hormônios). Em 1992 Bredt & Snyder, relataram que estudos utilizando inibidores da SON, tais como o N<sup>G</sup>-monometilarginina (L-NMMA) e a nitroarginina, bloqueavam o relaxamento não adrenérgico e não colinérgico em várias partes do sistema gastrointestinal, no corpo cavernoso do pênis e em vasos sanguíneos

cerebrais. Em muitas destas partes do organismo, o óxido nítrico preencheu critérios de neurotransmissor.

Após a purificação da SON foi possível classificá-la em dois tipos: indutivas (SONi) ou constitutivas (SONc). As do tipo indutivas estão presentes em macrófagos, neutrófilos, hepatócitos, e possivelmente em células gliais e respondem a estímulos patológicos, tais como liberação de citocinas. As do tipo constitutivas são encontradas apenas em neurônios e células endoteliais (Schuman & Madison, 1994) e sua atividade é controlada pelo nível de cálcio/calmodulina intracelular. No tecido nervoso, a SONc é estimulada quando o nível citoplasmático da concentração de  $Ca^{++}$  aumenta após a despolarização e ativação dos canais de  $Ca^{++}$  ou após o influxo de  $Ca^{++}$  através de canais receptores quando os receptores NMDA são ativados pelo glutamato (Bredt & Snyder, 1992).

De um modo geral, no sistema nervoso, o ON parece participar dos mecanismos de plasticidade sináptica e particularmente daqueles envolvidos com certas formas de aprendizagem e memória (Schuman & Madison, 1991). Além disso, evidências experimentais demonstraram que o ON participa de processos patológicos de neurotoxicidade mediados pelos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Dawson et al., 1993), da morte neuronal, que ocorre após isquemia focal (Nowicki et al., 1991; Huang et al., 1994) e do fenômeno convulsivo (Nakamura et al., 1995). Portanto, as ações abrangentes do ON são observadas, tanto em processos fisiológicos como patológicos.

Atualmente há na literatura várias evidências demonstrando uma estreita relação entre os neurônios produtores de ON e os neurônios NADPH-d positivos (Garthwaite, 1988; Snyder 1992). Considerando-se os papéis fisiológico e patológico do ON no sistema nervoso, é pertinente relatar evidências da literatura acerca da relação existente entre a SON e a NADPH-diaforase nos neurônios NADPH-d positivos.

### **1.3- SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO X NADPH-DIAFORASE**

Em 1961, Thomas & Pearse descreveram pela primeira vez a presença de neurônios grandes e isolados, dispersos em todo córtex cerebral e gânglio basal. Eles observaram que na presença de concentrações relativamente altas de NADPH, o sal solúvel de tetrazolium (um substrato sintético) era reduzido a partículas insolúveis; os grânulos de formazan. Estes grânulos, de coloração azul, precipitavam-se onde havia atividade enzimática no tecido. Essa atividade de NADPH-d caracterizava-se pelo requerimento imprescindível de NADPH. No corpo celular e dendritos dos neurônios NADPH-d positivos, a precipitação destes grânulos era responsável pela intensa marcação observada à microscopia óptica. Na neurópila (termo usual que se refere à densa matriz de axônios, dendritos e sinapses, situada entre os corpos celulares de neurônios e outros tecidos neurais), a marcação era fraca, refletindo uma atividade difusa da enzima.

Teoricamente, qualquer enzima que requeresse Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida (NADPH) poderia exercer atividade de



NADPH-diaforase. Entretanto, quando a histoquímica da NADPH-d foi aplicada no tecido cerebral de mamíferos fixados por aldeído, apenas uma população específica de neurônios foi marcada (Scherer-Singler et al., 1983). Estes neurônios NADPH-d positivos não puderam ser classificados em qualquer sistema clássico de neurotransmissores. Isto permaneceu um mistério até a descoberta dos neurônios produtores de ON no cérebro.

No início da década de noventa, a SON foi purificada e os anticorpos anti-SON foram sintetizados, o que permitiu o mapeamento imunohistoquímico dos neurônios produtores de ON no cérebro do rato (Bredt et al., 1990). Estudos utilizando a combinação de técnicas bioquímicas, histoquímicas e imunocitoquímicas mostraram que a enzima NADPH-d correspondia a SON (Hope et al., 1991; Matsumoto et al., 1993). Isso permitiu que os estudos acerca da distribuição da SON no cérebro, fossem feitos utilizando-se o método histoquímico para a NADPH-d.

Mais recentemente, Gabbott & Bacon (1995) e Valtschanoff et al. (1993) combinando técnicas histoquímicas e imunocitoquímicas evidenciaram que neurônios NADPH-d positivos também continham o ácido- $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Esses resultados indicam, portanto, que os neurônios NADPH-d positivos representam uma subpopulação de neurônios GABAérgicos de circuito local (Gabbott & Bacon, 1995). Além disso, estudos *in vitro* com células da retina de embriões de galinha (lentile et al., 1996; Spoerri et al., 1995; Yamashita & Fukuda, 1993) tem sugerido o envolvimento do GABA com ações neurotróficas durante o desenvolvimento.

Atualmente, a histoquímica da NADPH-d é o método mais amplamente utilizado para revelar a distribuição da SON no sistema nervoso. Com esta técnica, a anatomia dos neurônios produtores de ON foi descrita no sistema nervoso de muitas espécies de animais (Vincent & Kimura, 1992; Yan et al., 1994; Pérez et al., 1996). O método histoquímico da NADPH-d apresenta algumas vantagens em relação a imunocitoquímica e a hibridização in situ. A primeira delas é a utilização de poucos reagentes específicos. Outra vantagem deste método histoquímico, é a sua aplicabilidade em diferentes espécies de animais, uma vez que, tanto a imunocitoquímica como a hibridização in situ para a SON, são restritas a mamíferos (Elphick, 1997).

Conclui-se então, que o estudo histoquímico dos neurônios NADPH-d positivos pode revelar detalhes da morfologia e da distribuição dos neurônios produtores de ON no cérebro. Entretanto, o conhecimento da distribuição e da morfologia destes neurônios na área 17 é ainda muito restrito.

#### **1.4- DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DE NEURÔNIOS NADPH-D POSITIVOS NO CÓRTEX VISUAL PRIMÁRIO**

No cérebro do rato, o córtex visual está localizado na superfície dorsal da porção occipital do hemisfério cerebral e consiste de 3 áreas citológicas: 17, 18b e 18a. No rato, o córtex visual primário ou área 17 tem entre 1.3 e 1.5 mm de espessura e, como o neocórtex de outros mamíferos, contém 6 camadas (I - VI) (Peters, 1985).

Embora esteja disponível na literatura uma visão geral da distribuição e da morfologia dos neurônios NADPH-d positivos no cérebro de ratos (Vincent & Kimura, 1992), pouco se sabe a respeito dos detalhes morfológicos de tais neurônios, nas áreas do córtex visual desta espécie (Xiao et al.,1996).

As células NADPH-d positivas representam uma população especial de neurônios no neocórtex do rato, que se desenvolvem relativamente cedo e em um período de tempo relativamente curto durante o desenvolvimento, quando comparados com outros neurônios que expressam diferentes neuropeptídeos (Cavanagh and Parnavelas, 1988; Cavanagh and Parnavelas, 1990). Ao nascimento, estas células já podem ser encontradas no córtex cerebral e, ao fim da segunda semana de vida, tanto o número quanto a distribuição laminar apresentam o mesmo padrão do adulto (Yan et al., 1994).

Recentemente, Xiao et al. (1996) descreveram a distribuição dos neurônios NADPH-d positivos no córtex visual de hamsters. Nesta espécie, tais neurônios foram encontrados principalmente nas camadas V e VI. Vincent and Kimura, (1992) e Yan et al. (1994) encontraram em ratos maior concentração dos neurônios NADPH-d positivos nas camadas II/III, VI e substância branca do cérebro de ratos. Por outro lado, em macacos, tais células estão distribuídas principalmente nas camadas II/III e substância branca (Sandell, 1986, Costa et al, 1996).

Costa et al. (1996) estudando a atividade histoquímica da NADPH-d na área 17 de primatas e roedores, encontraram diferenças tanto na neurópila (atividade difusa), como na densidade de células nas substâncias branca e cinzenta. A camada IVc nos primatas e as camadas II/III nos roedores apresentaram a mais alta intensidade da atividade difusa da enzima. A densidade de células na substância branca dos primatas foi maior que na dos roedores.

Ao que tudo indica, o sistema visual parece ser bastante vulnerável a estímulos ambientais, durante o desenvolvimento. Venable et al. (1989) mostraram diferenças no córtex visual, entre ratos em desenvolvimento, mantidos em condições padrão, e aqueles expostos a estímulos multissensoriais diários. A desnutrição, como mencionado anteriormente, também promove alterações estruturais evidentes nesta área do cérebro (Bedi et al., 1989; Gundappa & Desiraju, 1988; Díaz-Cintra et al., 1990). Entretanto, a maioria dos trabalhos que se preocuparam em mostrar a organização neuroanatômica do córtex visual, limitaram-se a utilizar a técnica de Golgi para descrever os detalhes estruturais relativos ao corpo e aos processos celulares.

O presente trabalho investigou, os efeitos da desnutrição pré e pós-natal, sobre o padrão morfométrico dos neurônios NADPH-d, localizados na área 17, de ratos recém desmamados. Os resultados aqui obtidos poderão contribuir para esclarecer questões importantes, como: a desnutrição perinatal é capaz de afetar o desenvolvimento de neurônios NADPH-d

positivos, quando avaliados pela histoquímica da enzima? se a desnutrição altera o desenvolvimento dos neurônios NADPH-d positivos, que parâmetros morfológicos seriam mais afetados? Diante de tudo o que foi exposto, este trabalho tem em vista os seguintes objetivos:

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1) GERAL**

Investigar, os efeitos da desnutrição perinatal sobre a forma e a distribuição de neurônios NADPH-d positivos no córtex visual primário de ratos.

## **2.2) ESPECÍFICOS**

2.2.1) Definir à microscopia óptica o padrão de distribuição laminar da NADPH-diaforase na neurópila do córtex visual primário.

2.2.2) Realizar análise morfométrica, bi e tridimensional, através dos seguintes parâmetros:

- Espessura do córtex cerebral;
- Densidade de células na área 17;
- Área de campo dendrítico;
- Frequência de distribuição de ramos dendríticos;
- Pontos de Ramificação;
- Área de corpo celular;
- Ângulo das ramificações.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**



### **3.1- ANIMAIS E DIETAS**

Foram utilizados ratos recém-desmamados, da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE, divididos em dois grupos, segundo as dietas empregadas:

#### **3.1.2-Grupo Controle**

Constituído por 5 ratos (2 fêmeas + 3 machos) alimentados com a dieta de manutenção do biotério, desde o acasalamento das mães até a idade experimental (30-40 dias). Esta dieta que passará a ser denominada de dieta **Controle**, é produzida industrialmente e tem o nome comercial de LABINA (Purina do Brasil). Do ponto de vista nutricional, a dieta controle é equilibrada tanto na quantidade, como na qualidade de seus componentes e atende aos requerimentos nutricionais do rato. Ela apresenta 23% de proteínas, das quais grande parte, de origem animal (proteína de alto valor biológico) (ver tabela 1).

#### **3.1.3-Grupo Desnutrido**

O grupo desnutrido foi constituído por 5 animais (2 fêmeas+3machos). Os animais foram submetidos à desnutrição desde a gestação de suas mães até a idade experimental (30-40 dias). Para isto, empregou-se uma dieta quantitativamente normal do ponto de vista protéico (18% de proteína) (Reeves et al, 1993), porém qualitativamente deficiente (proteína de baixo valor biológico). A fonte protéica desta dieta era o feijão mulatinho. A farinha de mandioca e a batata doce, constituíam a principal fonte calórica (ver tabela

2). Pelo fato da proteína da dieta ser de origem vegetal, iremos denominá-la pelo nome de “Dieta com Proteína de Origem Vegetal” (Dieta POV).

### **3.2-ANÁLISE DO PESO CORPORAL E ENCEFÁLICO**

Para obtenção do peso corporal, os animais eram pesados no dia do desmame (25 dias idade) e no dia do sacrifício (30-40 dias de idade). Após perfusão, os animais eram decapitados e seus neuro-eixos seccionados transversalmente em duas regiões: caudalmente, ao nível da borda inferior do cerebelo, incluindo-o; rostralmente, no limite entre os polos frontais e os bulbos olfatórios, excluindo-os. Em seguida, os encéfalos eram retirados e pesados em balança analítica (modelo Bosch, S-2000, com sensibilidade até, 0,1 mg), obtendo-se assim o peso úmido do encéfalo.

### **3.3- PERFUSÃO E MICROTOMIA**

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de uretana a 12,5% e de cloralose a 0,5%, na dose de 0,8 ml/kg de peso. Inicialmente, para se fazer a perfusão do cérebro era necessário a retirada do sangue e a lavagem dos vasos. Assim, após ampla abertura do tórax do animal, expunha-se o coração e injetava-se 1,0 ml de heparina no ventrículo esquerdo para se evitar a coagulação sangüínea. Em seguida, era introduzida uma cânula de polietileno no ventrículo esquerdo e imediatamente fazia-se uma abertura no átrio direito. Esta abertura permitia, ao mesmo tempo, a saída do sangue e das soluções injetadas durante a perfusão. Com auxílio de um compressor, um volume em torno de 100-150 ml de solução

salina a 9%, era injetado pela cânula sob pressão (aproximadamente 90 mmHg). Este procedimento tinha por objetivo a remoção do sangue.

Após a remoção do sangue, seguia-se a fixação com o formaldeído 10% diluído em salina a 9%. O volume de fixador por animal variava entre 200 e 300 ml. Os indicadores para interrupção da fixação eram o tempo, o volume, a rigidez da cabeça e dos membros superiores.

Após a fixação, o animal era perfundido com soluções crioprotetoras, nas seguintes concentrações: 10, 20 e 40%. Essas três soluções eram preparadas a partir da diluição de uma solução padrão contendo: 100 g de sacarose, 45 ml de glicerol ou glicerina e 450 ml de tampão fosfato a 0,05M (pH 7,2-7,4). A diluição era feita adicionando-se tampão fosfato (0,05M), até a obtenção da concentração desejada. O volume de cada uma das soluções por animal variava entre 100 e 150 ml, procedendo-se a perfusão na ordem crescente de suas concentrações. Esta etapa tinha por finalidade evitar a formação de cristais de gelo no interior do tecido, já que os cortes eram feitos sob congelação.

Ao final da perfusão o animal era decapitado, a pele e os músculos da cabeça removidos com o bisturi. O crânio era aberto com auxílio de sacabocado e o encéfalo retirado após seção dos nervos cranianos e do bulbo olfatório. Em seguida, o encéfalo era pesado (com e sem cerebelo) e mergulhado em solução crioprotetora a 40% até a hora da microtomia.

Os encéfalos eram cortados em micrótomo de congelação (Leitz Wetzlar Germany 27554) em planos coronais. As fatias obtidas tinham espessura de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  e eram imersas imediatamente em solução crioprotetora a 40%. Seguiam-se então lavagens sucessivas dos cortes, cada uma com 5 min. de duração, em soluções crioprotetoras a 20% (1x), a 10% (1x) e em TRIS a 0,1M (pH 8,0) (3 x). Isto era feito com o objetivo de devolver ao tecido a osmolaridade próxima a do tampão fosfato 0,05M, sem promover súbitas mudanças da pressão osmótica, o que acarretaria danos ao tecido.

### **3.4- PROCEDIMENTO HISTOQUÍMICO**

A reação histoquímica para marcação dos neurônios NADPH-d positivos era feita de acordo com o método indireto da enzima málica (Scherer-Singler et al., 1983). Para isto, preparava-se uma solução contendo: 50 ml de tampão TRIS a 0,1M/l com pH em torno de 10 (pH não corrigido), 300 mg de ácido málico, 15 mg de nitrobluetetrazolium, 0,5 ml de dimetilsulfóxido, 12 mg de cloreto de manganês, 50 mg de  $\beta$ -NADP e 1,5 ml de triton X-100. Inicialmente, adicionava-se ao tampão TRIS o ácido málico e corrigia-se o pH para 8,0 com solução de hidróxido de sódio a 5N. Em seguida, adicionava-se a esta solução na seguinte seqüência o nitrobluetetrazolium diluído no dimetil sulfóxido, o cloreto de manganês, o  $\beta$ -NADP e por fim o triton X-100, tendo-se o cuidado de diluí-lo completamente por agitação.

Os cortes histológicos eram então incubados à temperatura ambiente na solução acima descrita e mantidos sob constante agitação, até a marcação da neurópila e das células NADPH-d positivas. A evolução da reação era acompanhada observando-se amostras dos cortes com auxílio de microscópio óptico (Zeiss). O critério adotado para interrupção da reação era a clara visualização dos dendritos terciários e de ordens superiores, na maioria das células marcadas. Após a interrupção da reação, os cortes eram lavados, pelo menos 3 vezes durante 15 min, em tampão TRIS a 0,1M/l (pH 8,0) e em seguida montados em lâminas gelatinizadas. Depois de aproximadamente 24 horas, quando os cortes estavam relativamente secos, eles eram desidratados em bateria de etanol e xileno e, finalmente, recobertos entre lâmina e lamínula com Permount ou Entelan. A partir deste ponto, as análises microscópicas podiam ser realizadas após uma a duas semanas.

### **3.5- ANÁLISES MICROSCÓPICAS**

De cada animal, foram utilizadas de 4 a 6 lâminas contendo a área 17, o que somou um número de 18 e 24 cortes para os grupos controle e desnutrido respectivamente. O critério utilizado para identificar os limites desta área era baseado na laminação das camadas, revelada pela marcação histoquímica da NADPH-d na neurópila. O reconhecimento dos limites da área 17 através da histoquímica da NADPH-d (ver figura 1) é semelhante àquele revelado pela técnica da citocromo oxidase (Hevner et al., 1995).

A partir destas lâminas foram feitas reconstruções do tipo bidimensional e tridimensional. A reconstrução (termo que será sempre utilizado para significar a representação gráfica das imagens observadas ao microscópio) bidimensional era feita com auxílio de uma câmara clara (equipamento que possibilita a reprodução gráfica em papel, da imagem vista ao microscópio pela projeção virtual em plano bidimensional) acoplada a microscópio óptico binocular (Zeiss Standard 25).

Para a reconstrução tridimensional de neurônios, utilizou-se um Sistema de Microscopia Automática, constituída de um computador, de um microscópio óptico binocular (Nikon) com platina motorizada, e de um programa operacional (Neuron Computation, desenvolvido pelo Centro de Pesquisa em Neurobiologia da Universidade do Alabama). Transdutores dos eixos X, Y e Z, acoplados a esse sistema, permitiam o registro tridimensional de cada ponto digitalizado na reconstrução.

### **3.5.1- Análise Bidimensional**

A análise bidimensional incluiu: medida da espessura das substâncias cinzenta e branca, contagem de neurônios NADPH-d positivos e medida da densidade de células, a partir da reconstrução da área 17 e; medidas da área de campo dendrítico e da distribuição da freqüência de ramos dendríticos com expressão da atividade da NADPH-d, a partir da reconstrução de neurônios NADPH-d positivos.

Para as medidas de espessura do córtex visual primário, foram utilizados 16 cortes contendo a área 17 para o grupo controle e 28 para o desnutrido. Para se estimar a espessura das substâncias branca e cinzenta na área 17 tomava-se por base os limites laterais e mediais pré-estabelecidos (ver figura 1). Utilizando um microscópio óptico binocular Zeiss, determinava-se a escala de trabalho com o auxílio de lâmina de calibração, lente ocular de calibração e objetiva de 3,2x. Após definição da escala de trabalho, media-se diretamente na lâmina histológica a espessura do córtex.

Para o cálculo da densidade foram realizadas 28 reconstruções da área 17 do grupo controle e 40 do grupo desnutrido. Esta diferença no número de reconstruções, ocorreu devido ao fato da qualidade do material histológico, contendo área 17, para o grupo controle ser inferior ao do grupo desnutrido. Para estas reconstruções utilizou-se uma objetiva de 6,3x. Após a delimitação dessa área nas substâncias cinzenta e parte da branca (computou-se apenas 100  $\mu\text{m}$  abaixo da substância cinzenta), dividia-se o número de neurônios distribuídos nesse espaço pela área desenhada, obtendo-se assim a densidade de células/ $\text{mm}^2$ . O valor da área era calculado com auxílio de mesa digitalizadora (Renoir, DIGIGRAF) acoplada a microcomputador e o número de neurônios era estabelecido a partir de contagem na área delimitada.

A análise morfométrica dos parâmetros celulares, foi feita a partir da reconstrução de 28 neurônios NADPH-d positivos do grupo controle e de 30 do grupo desnutrido, que estavam distribuídos na substância cinzenta da

área 17. Para a reconstrução, utilizou-se a objetiva de imersão PLAN 100x/1,25 e oculares com ganho de 10x. As células reconstruídas foram selecionadas das diversas camadas do córtex visual primário e o critério adotado para a seleção baseou-se principalmente na riqueza e nitidez dos processos celulares (dendritos e corpos celulares) estudados.

### **3.5.2- Análise Tridimensional**

As mesmas células reconstruídas na análise bidimensional (28 do grupo controle e 30 do grupo desnutrido), foram utilizadas para a análise tridimensional. Esta reconstrução, foi realizada com auxílio de objetiva de imersão a óleo (60x). Em seguida foram avaliados parâmetros como: extensão total da árvore dendrítica, densidade de pontos de ramificação/mm, ângulo médio das ramificações e área do corpo celular.

### **3.6- DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA**

Para a reprodução das fotomicrografias das células foi utilizado um fotomicroscópio automático monocular Nikon AFX-DX, com filme Kodak T-Max, ASA 100. As fotos do córtex incluindo os limites laterais e mediais da área 17, foram feitas em uma lupa Zeiss (MC 80) no aumento de 1,6x, com filme Kodacolor a cor 135mm, ASA 100.

### **3.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O teste t de Student foi utilizado para analisar todos os dados apresentados, com exceção da variável ângulo de ramificação. Os ângulos de ramificação foram apresentados sob a forma de frequência normalizada,



indicando o valor da frequência de ocorrência em um dado intervalo de classes de valores angulares. Em todos os casos, considerou-se como nível de significância para rejeição da hipótese nula, um valor de  $p \leq 0,05$ .

**Tabela 1-** Composição da dieta controle “Labina” (Purina do Brasil), usada na alimentação dos animais normais (N).

**COMPOSIÇÃO BÁSICA:** milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carboneto de cálcio, fosfato bicálcico, sal, pré-mix.

**ENRIQUECIMENTO POR KG DE RAÇÃO:**

Vitamina A .....	20000 UI
Vitamina D3 .....	6000 UI
Vitamina E.....	30 UI
Vitamina K .....	6 mg
Vitamina B12 .....	10 mcg
Vitamina B2 .....	8 mg
Pantotenato de Cálcio .....	24 mg
Niacina .....	95 mg
Tiamina .....	4 mg
Colina .....	2000 mg
Piridoxina .....	6 mg
Biotina .....	0,1 mg
Ácido Fólico .....	0,5 mg
Manganês .....	50 mg
Iodo .....	2 mg
Ferro .....	65 mg
Zinco .....	35 mg
Cobre .....	26 mg
Antioxidante .....	100 mg

**NÍVEIS DE GARANTIA**

Umidade (max.) .....	13,0 %
Proteína (mín.) .....	23,0 %
Extrato Etéreo (mín.) .....	2,5 %
Matéria fibrosa (max.) .....	9,0 %
Matéria mineral (max.) .....	8,0 %
Cálcio (max.) .....	1,8 %
Fósforo (mín.) .....	0,0 %

\* Segundo Purina do Brasil.

**Tabela 2-** Composição da dieta à base de “Proteína de Origem Vegetal” (POV) usada no grupo desnutrido

Ingredientes	g%	Composição Centesimal					
		Proteínas	Carboidratos	Lipídios	Cinzas	Fibras	Kcal
Feijão Mulatinho	83,11	18,08	42,29	1,08	2,97	4,98	275,20
Farinha de Mandioca	10,79	0,13	8,08	0,016	0,06	0,93	33,02
Batata doce	4,10	0,10	3,20	0,01	0,06	0,15	13,30
Vitamina Hidrossolúve I +Vit. B12	1,00	—	—	—	—	—	—
Vitamina Lipossolúvel	1,00	—	—	—	—	—	—
Total	100,0	18,31	53,57	1,106	3,09	6,06	321,52

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1- PESO CORPORAL E ENCEFÁLICO

Os animais desnutridos (D), alimentados com a dieta experimental contendo 18% de proteína de origem vegetal (POV), apresentaram uma redução de 42% do peso corporal em relação aos animais controle (C) (D-30,55 ± 0,21 e; C-52,45 ± 1,77; p<0,001), no dia do desmame. Quando atingiram a idade experimental (30-40 dias) este mesmo grupo apresentou um déficit de 57% do peso corporal em relação aos animais controle (D-41,95 ± 2,33 e; C-97,4 ± 0,71; p<0,001) da mesma idade. A comparação feita entre os grupos, mostrou que o peso encefálico também foi visivelmente reduzido nos animais desnutridos na idade experimental, porém em uma proporção menor que o peso corporal (15 e 13%) respectivamente para os pesos encefálicos com cerebelo (D-1,25 ± 0,12 e; C-1,46 ± 0,07; p<0,05) e sem cerebelo (D-0,97 ± 0,09 e; C-1,12 ± 0,06; p<0,05). Todas essas diferenças mostraram-se estatisticamente significantes e podem ser melhor visualizadas na tabela 3. Todos os pesos foram comparados pareando-se os animais de ambos os grupos quanto à idade, uma vez que a faixa etária, no dia do sacrifício, variou entre 30 e 40 dias.

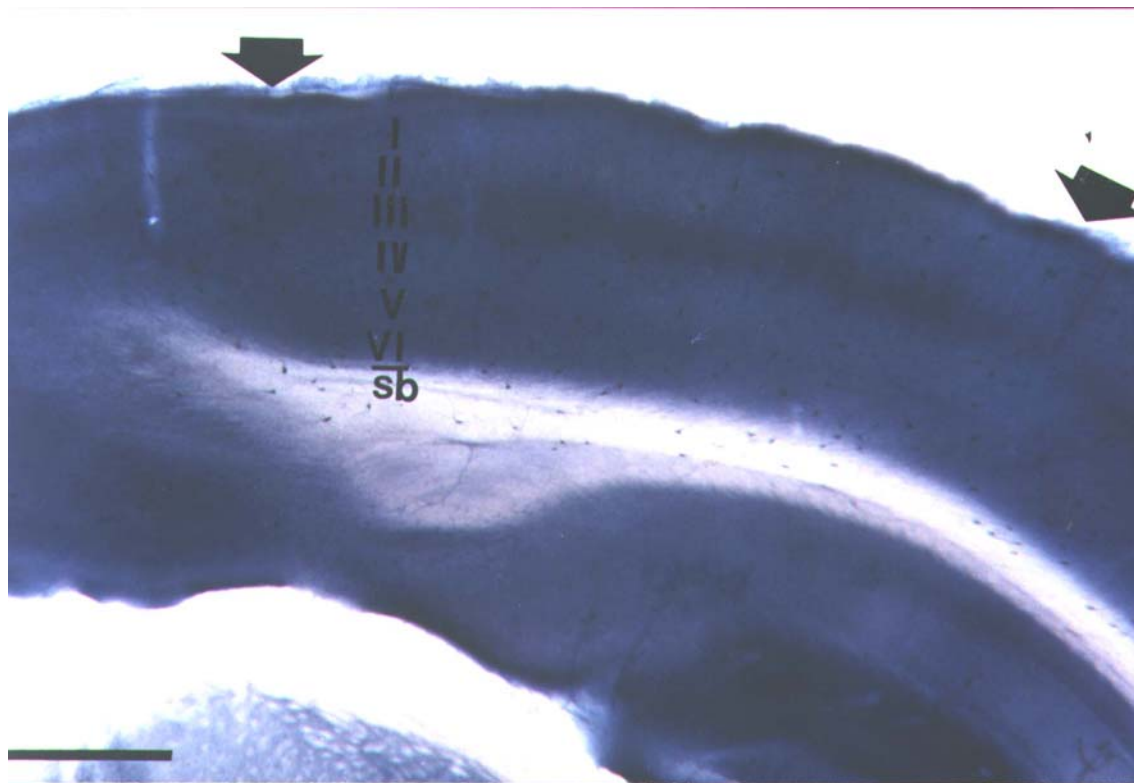
**Tabela 3-** Efeito da desnutrição crônica sobre os pesos corporais e encefálicos de ratos jovens submetidos à desnutrição perinatal.

<b>GRUPOS</b>	<b>PESOS CORPORAIS (g)</b>		<b>PESOS</b>	<b>ENCEFÁLICOS(g)</b>
	<b>25 d.</b>	<b>30-40 d.</b>	<b>C/cerebelo</b>	<b>S/Cerebelo</b>
<b>Controle</b>	52,45 ± 1,77 (5)	97,4 ± 0,71 (5)	1,46 ± 0,07 (5)	1,12 ± 0,06 (5)
Desnutrido	30,55 ± 0,21** (5)	41,95 ± 2,33** (5)	1,25 ± 0,12 * (5)	0,97 ± 0,09 * (5)

Ratos controle (22% de proteína) ou desnutridos (dieta à base de proteína de origem vegetal com 18% de proteína; POV) desde a gestação, foram pesados ao desmame e no dia do sacrifício (30-40 dias). Cada animal desnutrido foi comparado ao seu controle segundo à idade. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão, com o número de animais indicado entre parênteses. Teste t de Student. \*P < 0,05, \*\*P < 0,001.

#### 4.2- ATIVIDADE DIFUSA DA NADPH-DIAFORASE

A atividade histoquímica da NADPH-d na neurópila, do ponto de vista da microscopia óptica, foi qualitativamente semelhante para ambos os grupos. O padrão de distribuição laminar seguiu àquele anteriormente descrito por Hevner et al. (1995) para citocromo oxidase. As camadas II e III apresentaram a mais alta densidade da atividade difusa da NADPH-d, enquanto a camada IV e V revelaram a menor atividade enzimática (Figura 1). Na substância branca (SB) não há atividade da enzima. Ainda na figura 1 é possível identificar os limites laterais e mediais da área 17.

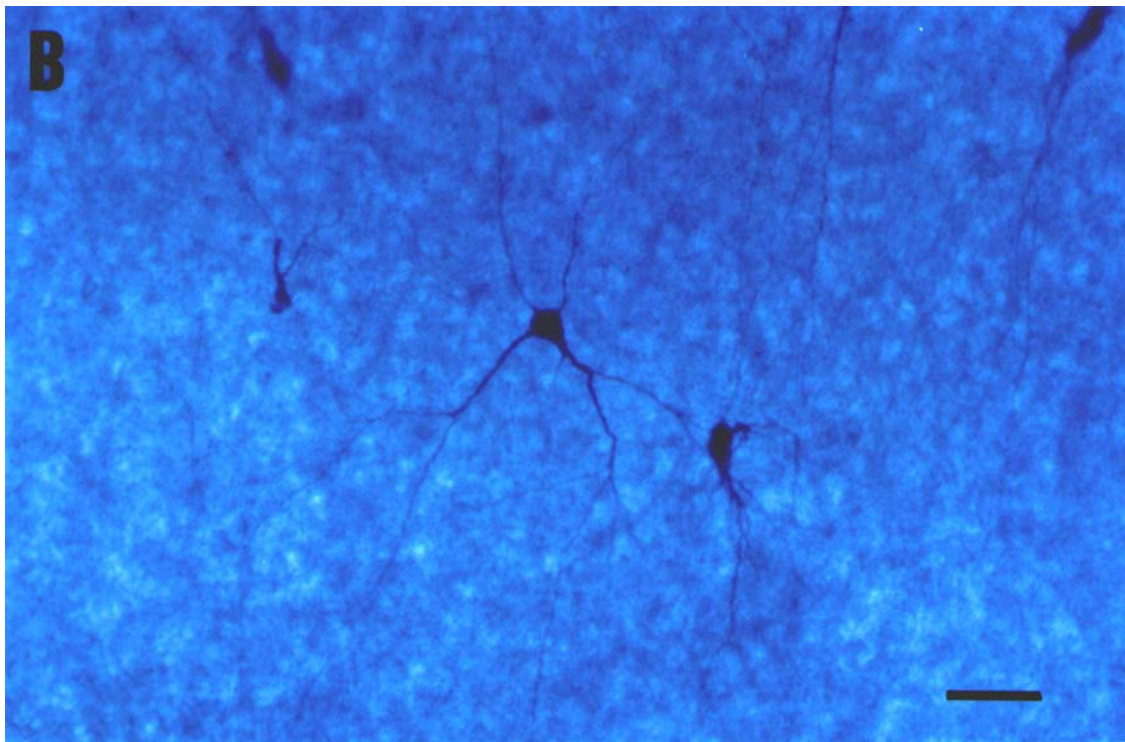
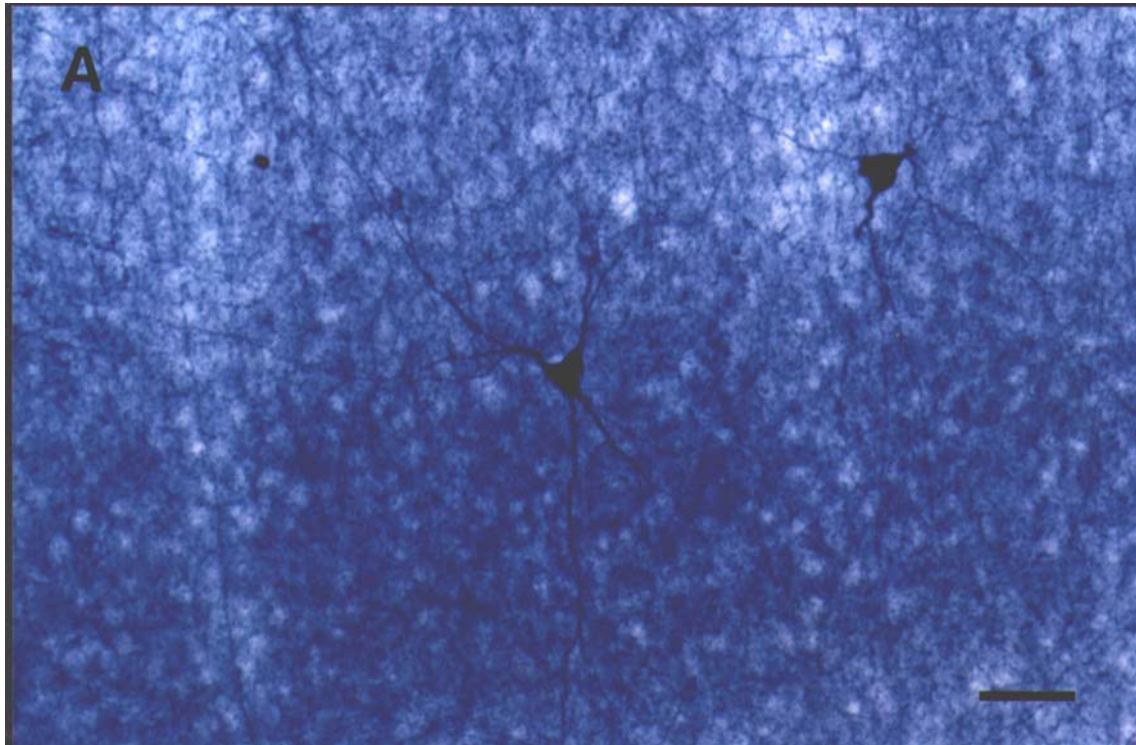


**Figura 1-** Atividade difusa da NADPH-diaforase após reação histoquímica no cérebro do rato controle. Fotomicrografia de um corte coronal, ilustrando a distribuição das camadas (I-VI) e os limites medial (seta à esquerda) e lateral (seta à direita). Escala: 1 mm.

## **4.3 - ANÁLISE BIDIMENSIONAL**

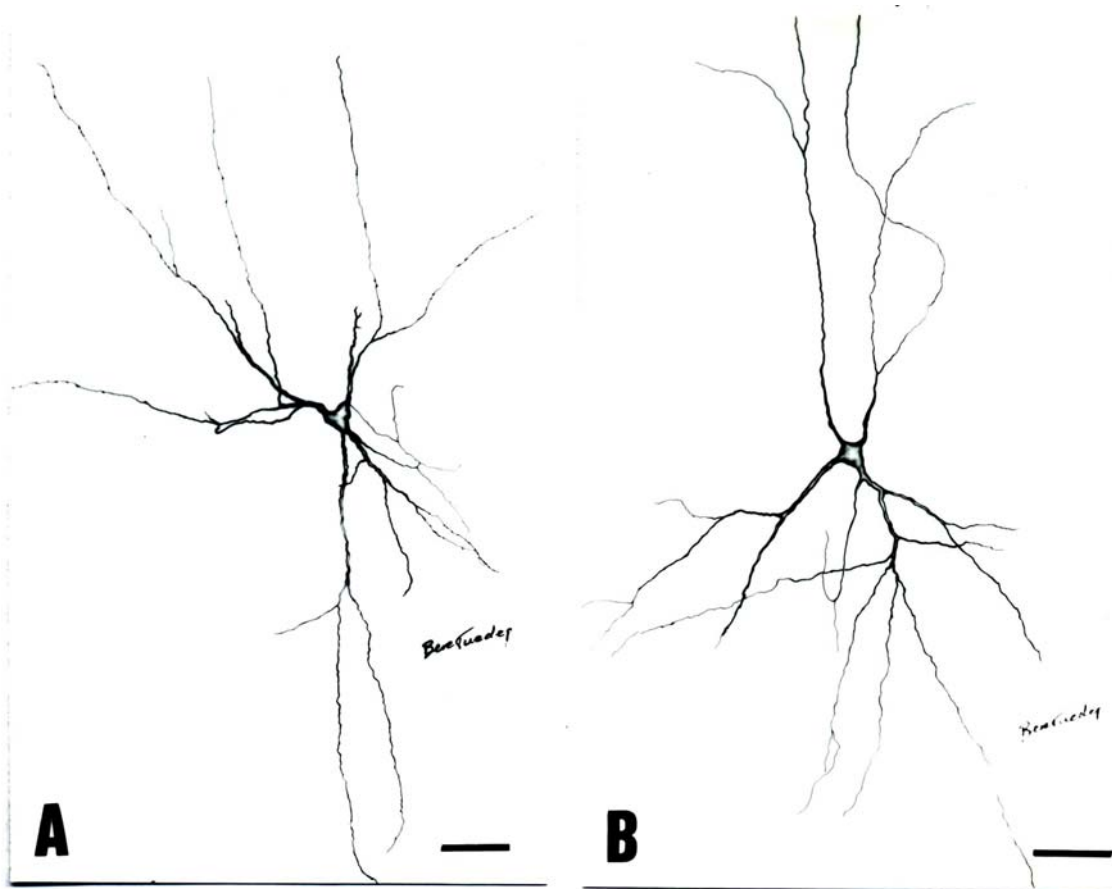
### **4.3.1- Morfologia Celular**

Em ambos os grupos a histoquímica para NADPH-d, revelou corpos celulares e dendritos fortemente marcados, que puderam ser visualizados por longas extensões ao microscópio em ambos os grupos (Figura 2: A e B; fotomicrografias e Figura 3: A e B; desenhos em câmara clara). Quanto aos axônios, dificilmente eram marcados e quando era possível identificá-lo, só se conseguia visualizá-los a curtas distâncias a partir do corpo celular. Em ambos os grupos, os neurônios NADPH-d estavam distribuídos por todo o córtex visual entre as camadas I-VI e na substância branca.



**Figura 2-** Fotomicrografias ilustrando o corpo celular e a arborização dendrítica de neurônios NADPH-d positivos de cérebros de ratos controle (A) e desnutridos (B). Escala:50 um. Considerando o padrão dendrítico, as células apresentam um aspecto muito similar em ambos os grupos.





**Figura 3-** Desenhos em câmara clara, ilustrando o corpo celular e a arborização dendrítica de neurônios NADPH-d positivos de cérebros de ratos controle (A) e desnutridos (B). Escala:50 um. Considerando o padrão dendrítico, as células apresentam um aspecto muito similar em ambos os grupos.

### 4.3.2 - Espessura do Córtex na Área 17

A espessura da substância cinzenta cortical (SC) foi significativamente reduzida ( $p < 0,01$ ) nos animais desnutridos ( $D-1167 \pm 50,7\mu\text{m}$ ) comparada àquela nos controles ( $C- 1248 \pm 49,5\mu\text{m}$ ). Por outro lado, as medidas da espessura da substância branca cortical (SB) na área 17 foram similares entre os dois grupos ( $D- 260 \pm 32,3 \mu\text{m}$  e;  $C- 280 \pm 54,7 \mu\text{m}$ ) (figura 4).

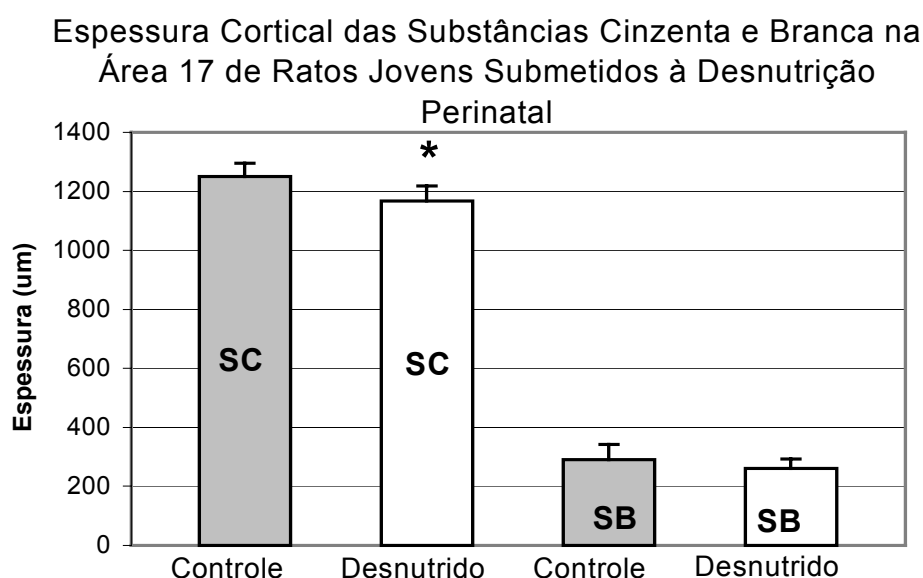
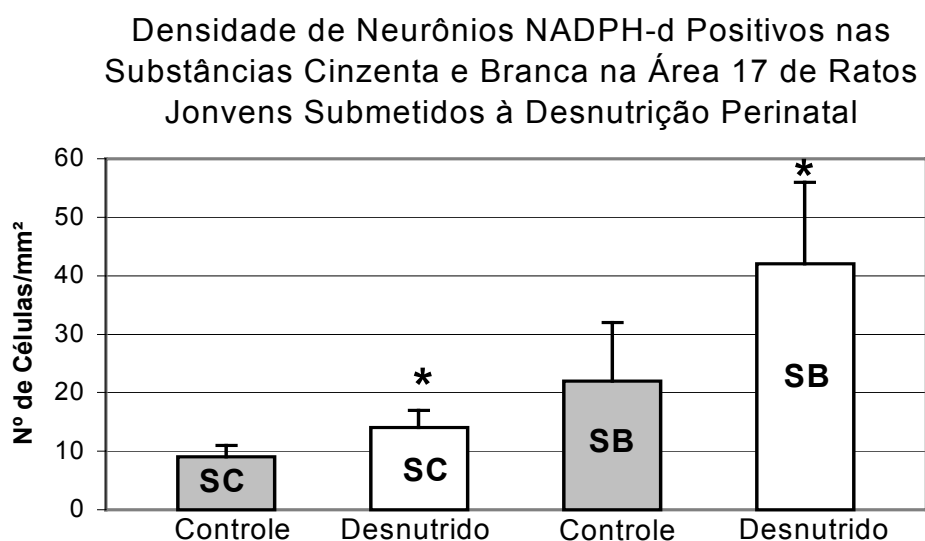


Figura 4- Medidas bidimensionais das espessuras das substâncias cinzenta (SC) e branca (SB) na área 17 de ratos controle (22% de proteína) ou desnutridos (dieta à base de proteína de origem vegetal com 18% de proteína; POV) desde a gestação. Para esta análise, foram empregadas 16 medidas/4 animais e 21 medidas/5 animais, no grupo controle e desnutrido respectivamente. Os resultados são expressos em médias  $\pm$  dp. Teste t de Student.  $*P < 0,01$ .

#### 4.3.3 - Densidade de Neurônios NADPH-d positivos na Área 17

A densidade de neurônios NADPH-d positivos na área 17, tanto na substância cinzenta dos animais desnutridos ( $14 \pm 3$  céls/mm<sup>2</sup>) como na branca ( $42 \pm 14$  céls/mm<sup>2</sup>) foi significativamente maior ( $p < 0,001$ ), quando comparada à densidade apresentada pelos controles nas substâncias cinzenta ( $9 \pm 2$  céls./mm<sup>2</sup>) e branca ( $22 \pm 10$  céls/mm<sup>2</sup>) respectivamente (figura 5).

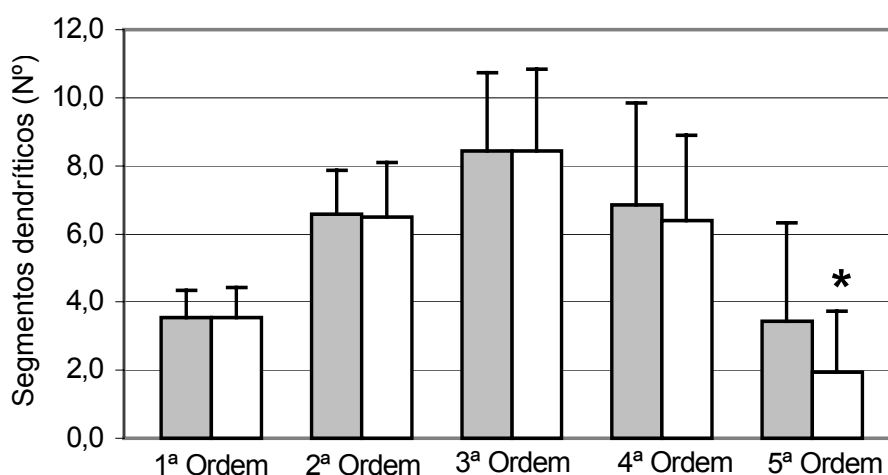


**Figura 5-** Contagem de neurônios NADPH-d positivos nas substâncias cinzenta (SC) e branca (SB) por unidade de área 17, de ratos controle (dieta com 22% de proteína) ou desnutridos (dieta à base de proteína de origem vegetal com 18% de proteína; POV) desde a gestação. A análise foi feita a partir dos desenhos em câmara clara dos limites da área 17. Para isto, foram empregadas 28 reconstruções de áreas 17 de 4 animais do grupo controle e 40 do grupo desnutrido. Os valores correspondem as médias  $\pm$  dp. Teste t de Student. \* $P < 0,001$ .

#### 4.3.4 - Atividade da NADPH-d nos Segmentos Dendríticos

Nos animais desnutridos, o número de ramos de 5ª ordem (figura 6) expressando atividade para NADPH-d ( $1,9 \pm 1,8$ ), estava reduzido ( $p < 0,05$ ) em comparação ao apresentado pelos controles ( $3,4 \pm 2,9$ ). Embora os neurônios NADPH-d positivos dos desnutridos tenham apresentado tendência à redução no número dos ramos de 4ª ordem em relação aos controles, essa diferença não foi significativa ( $D-6,4 \pm 2,5$  e;  $C-6,9 \pm 3,0$ ). Os números de ocorrência nas demais ordens de ramificação com expressão da atividade para NADPH-d também não apresentaram qualquer diferença.

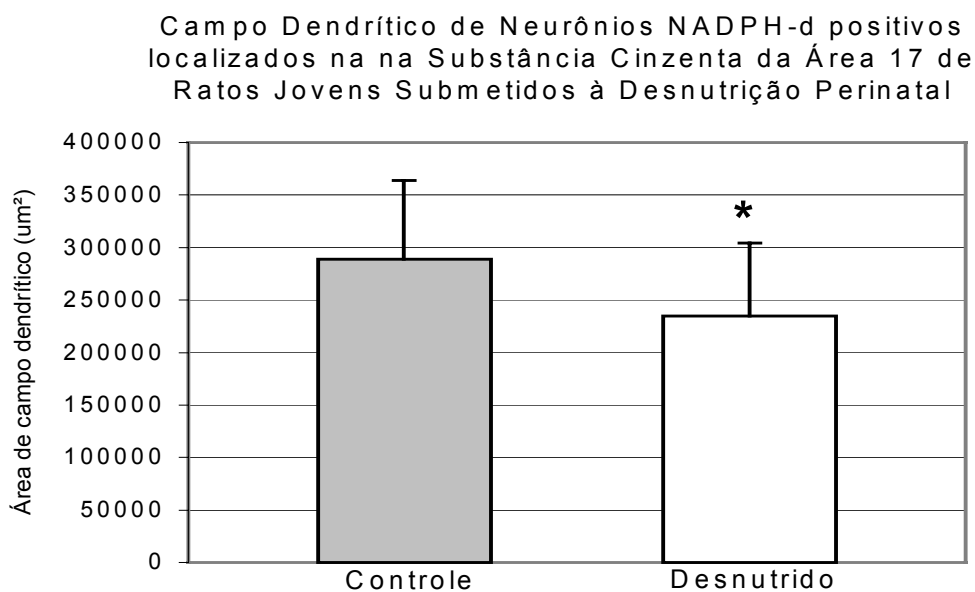
Distribuição de Dendritos Expressando NADPH-d em Neurônios NADPH-D Positivos na Substância Cinzenta da Área 17 de Ratos Jovens Submetidos à Desnutrição Perinatal



**Figura 6-** Contagem do número de segmentos dendríticos por ordem de ramificação de neurônios NADPH-d positivos na área 17, de ratos controle (dieta com 22% de proteína) ou desnutridos (dieta à base de proteína de origem vegetal com 18% de proteína; POV) desde a gestação. A análise foi feita a partir dos desenhos em câmara clara de 28 neurônios NADPH-d positivos de 4 ratos controle (■) e de 30 neurônios de 5 ratos desnutridos (□). Os valores representam as médias  $\pm$  dp. Teste t de Student. \* $P < 0,05$ .

#### 4.4.2 - Campo Dendrítico

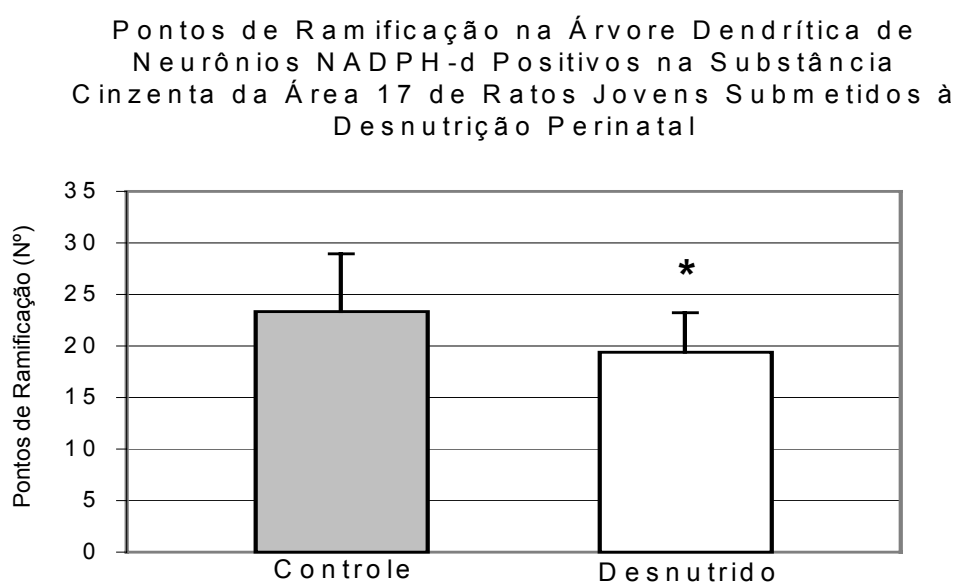
A área de campo dendrítico dos neurônios NADPH-d positivos, entre os animais desnutridos ( $234906 \pm 70806 \text{ um}^2$ ) apresentou redução ( $p < 0,01$ ) de 20% do território cortical, em relação a dos animais controle ( $289043 \pm 74890 \text{ um}^2$ ) (figura 7).



**Figura 7-** Áreas de campo dendrítico de neurônios NADPH-d positivos na área 17 de ratos controle (dieta com 22% de proteína) ou desnutridos (dieta à base de proteína de origem vegetal com 18% de proteína; POV) desde a gestação. As áreas foram estimadas a partir dos desenhos em câmara clara de 28 neurônios NADPH-d de 4 ratos controle e de 30 neurônios de 5 ratos desnutridos. Os valores representam as médias  $\pm$  dp ( $\times 10^3$ ). Teste t de Student. \* $P < 0,01$ .

#### 4.4.3 - Pontos de Ramificação

Quando a extensão total da árvore dendrítica dos neurônios NADPH-d positivos foi medida e comparada entre os grupos, não se observou qualquer diferença (C- $6,1 \pm 1,4$ mm e; D- $5,3 \pm 1,6$ mm). Por outro lado, comparando-se o número de pontos de ramificação (figura 8), entre os grupos, observa-se que este foi reduzido de forma significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo desnutrido ( $19 \pm 3,8$ ) comparado ao controle ( $23 \pm 5,6$ ).

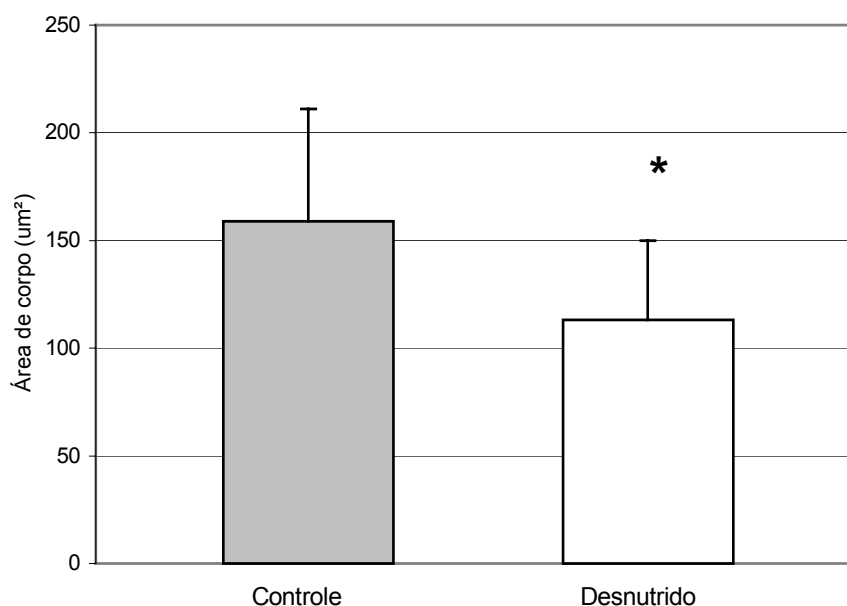


**Figura 8-** Pontos de ramificação de neurônios NADPH-d na substância cinzenta da área 17 de ratos controle (dieta com 22% de proteína) ou desnutridos (dieta à base de proteína de origem vegetal com 18% de proteína; POV) desde a gestação. O número de pontos de ramificação foi estimado a partir da reconstrução tridimensional de 28 neurônios NADPH-d positivos de 4 ratos controle e de 30 neurônios de 5 ratos desnutridos. Os valores representam as médias  $\pm$  dp. Teste t de Student.  $P < 0,05$ .

#### 4.4.4 - Corpo Celular

As medidas de área do corpo celular dos neurônios NADPH-d positivos localizados na substância cinzenta da área 17, mostraram redução ( $p < 0,05$ ) de 30% no grupo desnutrido ( $113 \pm 37 \text{ um}^2$ ) quando comparadas àquelas no controle ( $161 \pm 52 \text{ um}^2$ ) (figura 9).

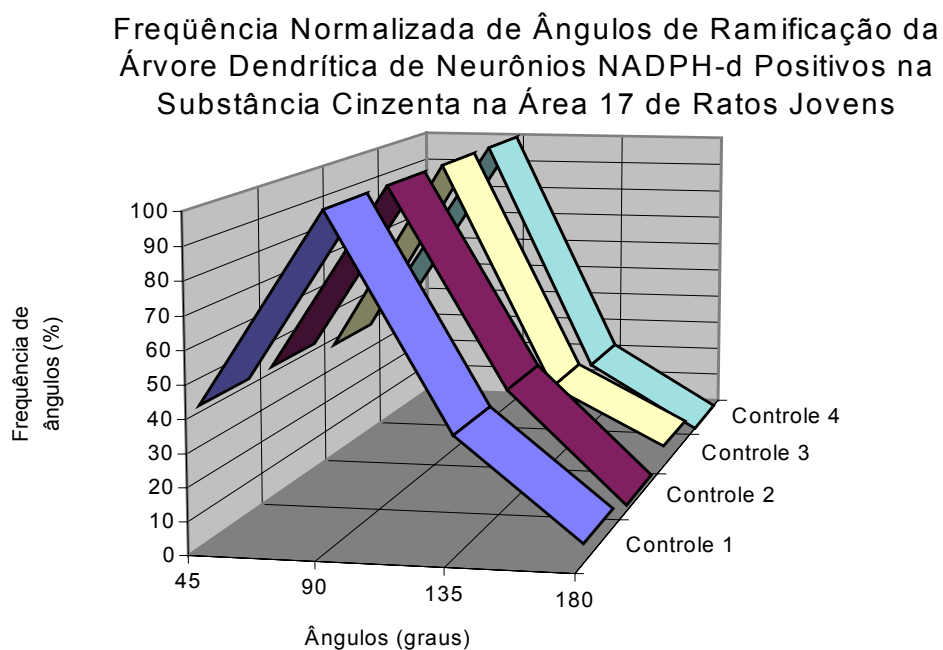
Área do Corpo Celular de Neurônios NADPH-d Positivos na Substância da Área 17 de Ratos Jovens submetidos à Desnutrição Perinatal



**Figura 9-** Área do corpo celular de neurônios NADPH-d positivos na substância cinzenta da área 17, de ratos controle (dieta com 22% de proteína) ou desnutridos (dieta à base de proteína de origem vegetal com 18% de proteína; POV) desde a gestação. As áreas foram estimadas a partir da reconstrução tridimensional de 28 neurônios NADPH-d positivos de 4 ratos controle e de 30 neurônios de 5 ratos desnutridos. Os valores representam as médias  $\pm$  dp. Teste t de Student. \* $P < 0,05$ .

#### 4.4.4 - Ângulos de Ramificação

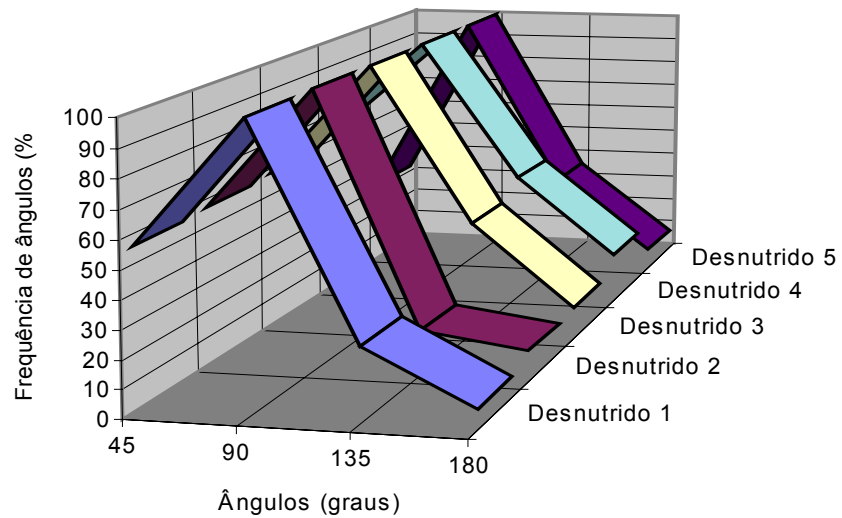
Por fim, na análise tridimensional, avaliou-se a distribuição dos ângulos de ramificação na árvore dendrítica dos neurônios NADPH-d positivos, localizados na área 17. Comparando-se a distribuição angular dos ramos dendríticos dos neurônios NADPH-d positivos, encontrou-se semelhança surpreendente, entre os grupos controle e desnutrido. Esta semelhança caracterizou-se pela maior concentração de ângulos de ramificação nos intervalos de 0-90° (figura 10 e 11).



**Figura 10-** Frequência normalizada de ângulos de ramificação da árvore dendrítica, estimada a partir da reconstrução tridimensional de 28 neurônios NADPH-d da substância cinzenta, na área 17 de 4 ratos controle. Os resultados são valores percentuais da maior frequência de ângulos.



Freqüência Normalizada de Ângulos de Ramificação  
de Neurônios NADPH-d Positivos na Substância  
Cinzenta da Área 17 de Ratos Jovens



**Figura 11-** Frequência normalizada de ângulos de ramificação da árvore dendrítica, estimada a partir da reconstrução tridimensional 30 de neurônios NADPH-d da substância cinzenta na área 17 de 5 ratos desnutridos. Os resultados são valores percentuais da maior frequência de ângulos.

## 5. DISCUSSÃO

## **5.1- DISCUSSÃO TÉCNICA**

No cérebro, a técnica da histoquímica para NADPH-diaforase revela a atividade da enzima na neurópila e em neurônios distribuídos por todo o córtex. Entretanto, é necessário que se discuta, neste ponto, os limites desta técnica para que, a seguir, se possa fazer a segura interpretação dos resultados. Com isso, pretende-se ressaltar a preocupação em empregar-se com critério esta técnica, utilizada pela primeira vez, na abordagem do problema da desnutrição.

### **5.1.1- Procedimentos Histológicos e Histoquímicos**

Durante a perfusão, variações do tempo, do volume e do pH das soluções podem prejudicar a reação histoquímica para a NADPH-d. Segundo Spessert & Laves, (1994), as condições de fixação afetam a intensidade mas não o padrão de marcação da enzima. Assim, estes autores demonstraram que a adição de glutaraldeído ao fixador, reduzia a atividade da enzima e que o prolongamento do tempo de fixação resultava no desaparecimento da marcação histoquímica da NADPH-d.

No presente trabalho, constatou-se que a reação histoquímica para a NADPH-diaforase em cortes de cérebros super ou sub fixados não se processava adequadamente. Ma maioria das vezes as células eram fracamente marcadas, o que não permitia uma visualização completa da árvore dendrítica. Por este motivo muitas amostras foram descartadas. Assim, procurou-se padronizar, sempre que possível, o volume, o tempo, a pressão e o pH das soluções durante a perfusão. Para sistematizar as

eventuais fontes de erro durante o procedimento, os animais eram sempre perfundidos aos pares (controle/desnutrido) com as mesmas soluções. O grau de fixação também tem uma implicação direta com o tempo da reação histoquímica, ou seja, quanto menor a fixação menor o tempo de reação. Por outro lado, não é interessante que ela ocorra tão rapidamente, porque isso promove a marcação da neurópila antes da adequada marcação dos neurônios.

As principais variáveis limitantes da reação histoquímica para NADPH-d são: tempo, temperatura, pH, padrão de agitação e espessura do corte (Thomas & Pearse, 1961). A espessura dos cortes guarda relação direta com o tempo de reação, com o grau de permeabilização do tecido e com a escolha do tipo de análise que se objetiva fazer. O pH das soluções de reação deve ser padronizado de acordo com o protocolo da técnica e ajustado para que a reação ocorra normalmente. O tempo total da reação é muito variável e depende direta ou indiretamente dos vários fatores aqui abordados. O que determina, de fato, a hora de interrupção da reação é a observação, ao microscópio, da completa marcação da maioria dos neurônios com seus dendritos terciários, bem como da neurópila (Picanço-Diniz, 1998 comunicação pessoal). Na literatura é usual incubar os cortes histológicos durante a reação histoquímica à temperatura de 37°C. Isso promove o término da reação dentro de 30-60 min. Entretanto, caso não haja um controle rigoroso dessa temperatura o “background” da reação pode ficar muito intenso prejudicando a qualidade do material. Por outro lado, à

temperatura ambiente, a reação torna-se mais lenta (4-5 horas), o que permite controlar adequadamente a marcação das células e da neurópila.

Aqui, quando o material histológico gerado, indicava problemas na fixação ou no tempo de reação (superestimado ou subestimado), era desprezado. Tal procedimento era adotado com o objetivo de eliminar os eventuais problemas durante a análise microscópica. A forma utilizada durante a microscopia para se escolher seções homogêneas para a análise, foi a de selecionar apenas aquelas com grau adequado de marcação nos diferentes planos de foco.

É importante lembrar que a técnica da histoquímica para a NADPH-d se restringe a marcar uma pequena população neuronal que corresponde a aproximadamente 1%-2% de todos os neurônios corticais (Snyder, 1992). Além disso, essa técnica se restringe a marcar o soma e os processos dendríticos dos neurônios NADPH-d. Para se fazer a marcação dos axônios, faz-se necessário a injeção de marcadores intra ou extracelulares, tais como a biocitina (Picanço-Diniz et al., 1992).

### **5.1.2- Técnicas de Reconstrução**

As técnicas de reconstrução exigem que sejam estabelecidos critérios, para que a célula reproduzida em câmara clara seja o mais fiel possível a célula presente na lâmina. Uma boa célula para reconstrução deve estar com sua árvore dendrítica preservada, ou seja, conter o mínimo possível de dendritos cortados. Por essa razão, as células da substância

branca foram eliminadas da análise, uma vez que elas têm o padrão de arborização ortogonal ao plano de corte utilizado. Além disso, a célula selecionada para reconstrução não deve estar sobreposta por células vizinhas e seu plano de foco deve ser confortável para o microscopista. Considerando as limitações técnicas durante a reconstrução bi ou tridimensional, procuramos sistematizar todas as etapas a fim de minimizar os possíveis erros de interpretação.

## **5.2- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

O presente trabalho mostrou que a desnutrição foi capaz de promover alterações nos pesos corporais e encefálicos, bem como nas espessuras corticais da área 17. Além disso, demonstrou que os neurônios NADPH-d positivos, localizados na área 17 dos ratos desnutridos, exibiram alterações morfológicas na maioria dos parâmetros avaliados: densidade, número de dendritos de 5ª ordem expressando atividade para NADPH-d, área de campo dendrítico, número de pontos de ramificação e área do soma.

O modelo de desnutrição empregado promoveu reduções ponderais e encefálicas. Esses resultados confirmam aqueles encontrados por Teodósio et al. (1990) empregando a Dieta Básica Regional (DBR) para induzir desnutrição em ratos. Esse modelo experimental foi desenvolvido pelo Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, a partir de inquéritos sobre o consumo alimentar na Zona da Mata de Pernambuco (Coutinho, 1976), região cuja incidência de desnutrição ainda se mantém elevada. No modelo de desnutrição aqui empregado, é provável

que a deficiência protéica tenha provocado alterações na quantidade e na qualidade do leite materno, principal fonte alimentar até o desmame. A alteração quantitativa e/ou qualitativa do leite materno poderia justificar a desnutrição dos filhotes já ao desmame. Essa hipótese baseia-se em evidências experimentais em ratos, demonstrando redução na concentração de nutrientes essenciais do leite (Marín et al, 1995) e alteração no tamanho das glândulas mamárias (Pine & Jessop, 1994), na desnutrição materna. O fato do déficit no peso dos animais desnutridos, ter aumentado ainda mais após o desmame em relação aos controles, pode ser explicado pela grave carência nutricional da dieta POV, especialmente a protéica. Essa evidência confirma dados anteriores encontrados em nosso laboratório por Teodósio et al. (1990).

A redução do peso do encéfalo úmido, observada no grupo desnutrido é similar àquela encontrada por Monteiro (1995) em ratos desnutridos, desde a gestação até os 42 dias de vida, e em seguida recuperados. Todavia, Díaz-Cintra et al. (1990) e Fernández et al. (1993) não encontraram reduções no peso do cérebro de ratos desnutridos. A discrepância encontrada por estes autores, em relação aos nossos resultados, poderia ser explicada pela diferença na qualidade da proteína empregada na dieta. Eles utilizaram nas dietas, baixos teores de proteína de alto valor biológico enquanto, no presente trabalho, utilizou-se teores quantitativamente adequados, de proteína qualitativamente deficiente, aos requerimentos do rato.

Em resposta a desnutrição, o encéfalo é menos atingido do que qualquer outro órgão. Isto é verificado quando calcula-se o peso do encéfalo como uma proporção do peso corporal. Esse fato, classicamente referido por Winick & Noble (1966), demonstra que mecanismos de proteção entram em jogo, para poupar o cérebro da agressão nutricional em relação a outros órgãos. Essa evidência foi confirmada no presente estudo, uma vez que a relação peso encefálico/peso corporal no grupo desnutrido, foi duas vezes maior que no grupo controle.

A redução do peso e do tamanho encefálico, em ratos, parece estar principalmente associada à desnutrição pós-natal, quando a diferenciação celular extensiva e a multiplicação glial relacionada à oligodendrogliogênese e mielinização são mais visíveis (Morgane et al, 1993). Diante de todas as evidências, pode-se afirmar que o modelo experimental aqui utilizado alterou, de fato, parâmetros anatômicos do corpo e do encéfalo. Ao contrário de alguns estudos anteriormente citados, pode-se afirmar neste trabalho que a desnutrição afetou o encéfalo. A seguir, serão discutidas as alterações finas que ocorreram no córtex visual primário e particularmente aquelas observadas nos neurônios NADPH-d positivos.

A atividade difusa da NADPH-d no homem (Faro et al., 1995) assim como no rato adulto (Xiao et al., 1996), pode ser observada nas 6 camadas corticais da área 17. Segundo Yan et al. (1994), ao nascimento, a atividade histoquímica da NADPH-d na neurópila de ratos aparece apenas nas camadas V e VI. Ao final da primeira semana pós-natal, essa atividade se



expande, tornando-se mais intensa nas camadas II/III. Durante a segunda e terceira semana a atividade enzimática se estabiliza até a idade adulta. À medida que o córtex envelhece, começa a haver um declínio geral na intensidade dessa atividade na neurópila cortical (Kuo et al., 1997; Yan et al., 1994).

No presente trabalho, o padrão laminar adulto da neurópila cortical observado por Yan et al. (1994) logo na 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semana de vida pós-natal, foi confirmado na área 17 de ratos com 30-40 dias de vida. Um aspecto relevante aqui observado, é que a agressão nutricional não alterou o padrão qualitativo da atividade histoquímica da NADPH-d na neurópila cortical. Isso também foi observado em outras regiões cerebrais após condições de agressão como isquemia (Ferriero et al., 1988), lesões estriatais induzidas por ácido homocistéico (Beahl et al., 1990) e doença de Alzheimer (Woolf et al., 1989). Entretanto, como será discutido mais adiante, a desnutrição induziu alterações estruturais a nível celular, só detectadas a partir de análise microscópica mais minuciosa.

É importante esclarecer que tanto a avaliação qualitativa ao microscópio como a adoção de métodos fotométricos, não são indicativos da verdadeira atividade da enzima na neurópila. Ambas as formas de avaliação estão sujeitas às limitações impostas pela técnica histoquímica da NADPH-d. Uma exceção para adoção de tais procedimentos, é aquela dedicada aos casos em que não há atividade histoquímica da enzima. Isto ocorre nos casos de remoção das projeções NADPH-d positivas, para a região a ser

estudada (Do Nascimento, 1995). Diferente da avaliação histoquímica, a medida bioquímica da enzima em tecido fresco (não fixado), permitiria, de fato, avaliar o impacto da desnutrição sobre sua atividade na neurópila cortical.

As revisões de Ballabriga (1990) e Morgane et al (1992), relatam que a desnutrição é responsável por uma redução da espessura do córtex durante o desenvolvimento. No presente trabalho, isto foi confirmado em relação à substância cinzenta (SC). Por outro lado, no desnutrido, nenhuma alteração foi encontrada na espessura da substância branca (SB) na área 17. Essa evidência, resguardados os limites da metodologia empregada, poderia sugerir uma agressão diferenciada para as substâncias branca e cinzenta.

Nos animais desnutridos, o aumento da densidade de neurônios NADPH-d positivos na SC sugere maior agrupamento dos elementos celulares na área 17. Uma possível explicação para isto é a redução das dimensões neuronais (Morgane et al., 1978). Esse achado, indicativo de “empacotamento” celular, também foi observado por Gambetti et al.(1974). Na substância branca, por outro lado, não há evidências suficientes para afirmarmos que este fenômeno tenha acontecido, embora o aumento da densidade celular também tenha sido observado.

Algumas hipóteses podem ser levantadas acerca do aumento da densidade de neurônios NADPH-d positivos na SB dos desnutridos. Debassio & Kemper (1985) estudando os efeitos da desnutrição protéica na

migração neuronal, encontraram redução dessa taxa para o bulbo olfatório em ratos desnutridos, em comparação aos seus respectivos controles. Com base nesse achado é possível especular que tenha havido retardo da migração neuronal dos neurônios NADPH-d positivos e que por isso se tenha encontrado aumento na densidade na SB.

Durante o desenvolvimento, o processo de superprodução de neurônios seguido por redução drástica dessas células, ocorre em quase todas as regiões do sistema nervoso central e periférico e é geralmente denominado de morte neuronal programada (Morgane et al., 1993). Evidências indicam que esse processo ocorre com os neurônios NADPH-d positivos. Esses neurônios, segundo Valtchanoff et al. (1993) também expressam atividade para GABA e ON. Assim, Kimura & Baughman (1997) mostraram que o número de neurônios GABAérgicos transcalosos, supostamente NADPH-d positivos, declina substancialmente após o nascimento. Portanto, o aumento na densidade dos neurônios NADPH-d positivos na SB, sugere a hipótese de que havia ocorrido retardo na morte neuronal programada dos neurônios NADPH-d positivos, nesta região cortical.

Segundo Ientile et al. (1996) neurônios GABAérgicos podem exercer papéis funcionais bem definidos na plasticidade sináptica mediada pelo ON durante o desenvolvimento neural. A importância do papel do GABA nos fenômenos de plasticidade vem sendo confirmada por vários autores (Ientile et al., 1996 ;Spoerri et al., 1995; Yamashita & Fukuda, 1993). Spoerri et al.

(1995) demonstraram *in vitro* que os efeitos neurotóxicos do etanol durante a diferenciação neuroblástica de embriões de galinha, podiam ser prevenidos pelas ações neurotróficas do GABA. Portanto, o aumento na densidade dos neurônios NADPH-d positivos na SB cortical de animais desnutridos vem reforçar a idéia de que o cérebro procura se adaptar a situações de agressão, na tentativa de preservar funções vitais para a sobrevivência da espécie.

Com relação a distribuição dos segmentos dendríticos, os animais desnutridos mostraram redução no número de ramos de 5ª ordem expressando atividade para NADPH-d. Fernández et al. (1993), demonstraram que em neurônios piramidais do córtex motor, de animais eutróficos ou desnutridos criados em condições ambientais empobrecidas, houve sensível redução no comprimento e no número de dendritos de ordens superiores. Esse achado indicou redução das áreas de campo receptivo, sugerindo que o desenvolvimento das conexões dos neurônios piramidais no córtex motor poderia ser prejudicado. Ao mesmo tempo, Fernández et al. (1993) avaliando isoladamente o efeito da desnutrição pós-natal sobre parâmetros morfológicos, não encontraram alterações anatômicas em neurônios piramidais do córtex motor.

Apesar de se tratar de uma área cortical e de uma população neuronal diferente da estudada por Fernández et al. (1993), o presente trabalho confirma achados anteriores, mostrando que o córtex visual é muito sensível aos efeitos da desnutrição (Diaz-Cintra et al., 1990; Leuba & Rabinowicz, 1979; Morgane et al., 1978) e que a eficácia dos contatos sinápticos

mediados pelo óxido nítrico durante o desenvolvimento do sistema nervoso, poderiam estar prejudicados (Yan et al., 1994). Essa hipótese também é reforçada no presente trabalho pela redução no número de pontos de ramificação nos neurônios NADPH-d positivos nos desnutridos.

A desnutrição reduziu a área de campo ocupada pela árvore dendrítica dos neurônios NADPH-d positivos na área 17. Segundo Fernández et al. (1993), o efeito isolado da desnutrição não altera a área de campo dendrítico dos neurônios piramidais localizados no córtex motor. O argumento dado por ele baseia-se no fato de que tarefas motoras essenciais devem ser preservadas em ratos desnutridos neonatos. Esses achados são contraditórios com os encontrados aqui, porém como discutido acima, as diferenças nas áreas corticais e na população neuronal em questão poderiam esclarecer estas diferenças. Embora a base fisiológica para estes efeitos da desnutrição não esteja clara, é possível que a insuficiência de proteínas e de aminoácidos essenciais na dieta pudessem ter causado alterações na estrutura dendrítica dos neurônios NADPH-d positivos.

A área do corpo celular dos neurônios NADPH-d positivos localizados na substância cinzenta do córtex visual primário, estava reduzida nos animais desnutridos. Os dados do presente estudo, diferem daqueles encontrados por Díaz-Cintra et al (1990) e García-Ruiz et al (1993), acerca do tamanho dos eixos e do perímetro do soma de células piramidais, em ratos submetidos a uma desnutrição crônica. Nesses trabalhos, o efeito das dietas (caseína 8% e 6%) não apareceu sobre tais parâmetros aos 30 dias,

mas os reduziu aos 220 dias de vida, em comparação com os respectivos controles. Isso poderia indicar que a curto prazo, o corpo celular seria capaz de resistir ao impacto das dietas hipoprotéicas à base de caseína (proteína de alto valor biológico), mas não a dietas tão deficientes, como a POV (proteína de origem vegetal), empregada no presente trabalho.

Um dado interessante é aquele relativo aos ângulos de ramificação dos segmentos dendríticos dos neurônios NADPH-d positivos na área 17. Apesar das alterações anatômicas ocorridas na arquitetura dos neurônios NADPH-d positivos dos animais desnutridos, a distribuição dos valores angulares entre os grupos manteve-se similar. Essa similaridade é traduzida pelos maiores valores da frequência normalizada situados no intervalo de classe entre 0-90 graus. O significado preciso desse resultado não é conhecido e mais estudos são necessários para esclarecê-lo.

### 5.3- EFEITO DA RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL

O presente trabalho é parte de um projeto instituído entre as Universidades Federal do Pará e de Pernambuco no ano de 1996. Este projeto tem por objetivo implantar recursos que possibilitem o desenvolvimento de técnicas histológicas no Laboratório de Fisiologia da Nutrição deste Departamento. Até o momento, foram concluídos, dentro do projeto, dois trabalhos de investigação em ratos desnutridos utilizando a técnica da histoquímica para a NADPH-d. Um dos estudos, investigou o efeito da recuperação nutricional sobre parâmetros morfométricos de neurônios NADPH-d positivos localizados no córtex visual primário de ratos adultos,

desnutridos no início da vida (Araújo, 1998). O outro, é o trabalho que está sendo discutido aqui. Alguns dados revelados por estes estudos e comparados entre si reforçam dados encontrados na literatura. A seguir, estes dados serão apresentados e discutidos.

Em ambos os trabalhos, as densidades de neurônios NADPH-d positivos na SC e na SB foram visivelmente maiores tanto nos ratos jovens desnutridos como nos adultos recuperados, em relação aos controles de mesma idade. Comparando-se as densidades de neurônios NADPH-d positivos na SC e na SB da área 17 de ratos jovens (controle e desnutridos) (figura 5) com a de adultos (controle e recuperados) respectivamente (figura 12), pode-se observar que não há diferença entre elas. Tanto na SC como na SB, os achados da densidade de neurônios NADPH-d positivos na área 17 dos ratos controles de diferentes idades, confirmam os dados de Yan et al. (1994), que demonstraram a estabilização do número de neurônios NADPH-d positivos, a partir da segunda semana de vida pós-natal. Da mesma forma, não se observa diferença nas densidades de neurônios NADPH-d positivos localizados nas SC e SB da área 17, de desnutridos jovens comparados aos adultos recuperados. Esse achado indicou que a recuperação nutricional após o período de desnutrição crônica não restituiu o padrão adulto da densidade celular encontrada no controle.

A comparação dos dados de densidade na SC no presente estudo com os de Araújo (1998), sugere que a redução da espessura cortical e das dimensões neuronais, ocorridas no animal jovem tenham desaparecido após

recuperação nutricional. A elevada densidade de neurônios NADPH-d positivos na SB encontrada no presente trabalho foi similar àquela observada por Araújo (1998) em ratos adultos recuperados de desnutrição.

Efeito da recuperação Nutricional sobre a Densidade de Neurônios NADPH-d Positivos nas Substâncias Cinzenta e Branca da Área 17 de Ratos Adultos

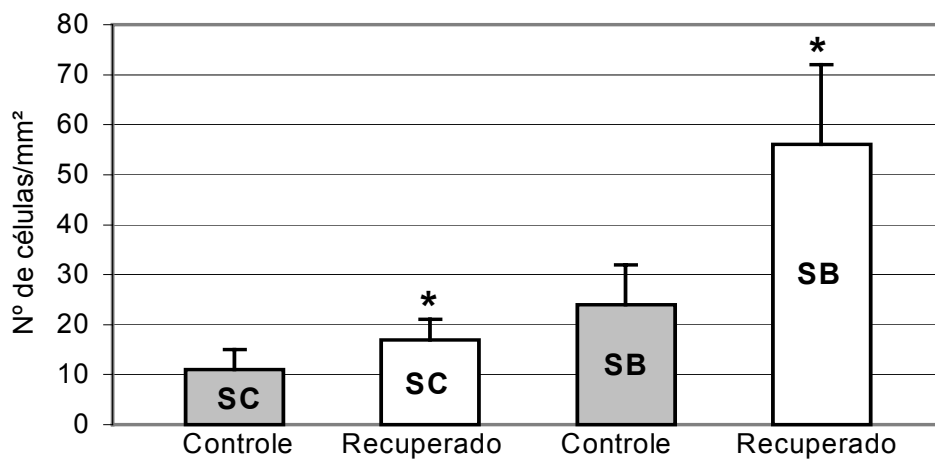


Figura 12 – Contagem de neurônios NADPH-d positivos nas substâncias cinzenta (SC) e branca (SB) por unidade de área 17, de ratos controle (dieta Labina com 22% de proteína) ou desnutridos no início da vida com DBR (dieta com 8% de proteína) e recuperados com Labina a partir dos 42 dias de idade. A análise foi feita a partir dos desenhos em câmara clara dos limites da área 17. Os valores correspondem as médias  $\pm$  dp. Teste t de Student. \* $P < 0,05$  (Araújo, 1998).



O aumento na área do corpo celular (figura 13), demonstrada por Araújo (1988), foi um indicativo de que a recuperação nutricional reverteu o efeito promovido pela desnutrição crônica imposta no início da vida em ratos jovens (figura 9).

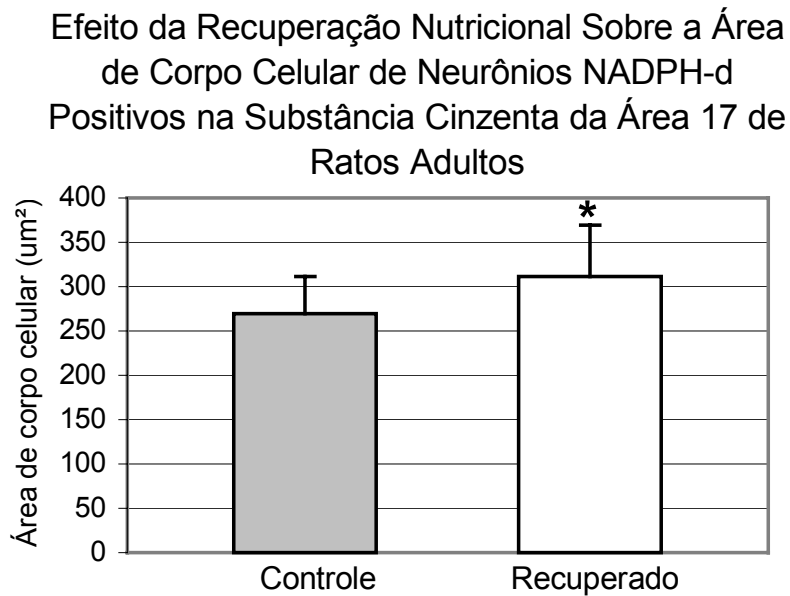


Figura 13 - Área do corpo celular de neurônios NADPH-d positivos na SC da área 17, de ratos controle (dieta Labina com 22% de proteína) ou desnutridos no início da vida com DBR (dieta com 8% de proteína) e recuperados com Labina a partir dos 42 dias de idade. A análise foi feita a partir dos desenhos em câmara clara de neurônios NADPH-d positivos de ratos controle e recuperados localizados na área 17. Os valores correspondem as médias  $\pm$  dp. Teste t de Student. \*P<0,05 (Araújo,1998).

Comparações feitas entre as área de campo dendrítico dos neurônios NADPH-d positivos na SC da área 17 de ratos controle jovens (figura 7) com ratos controle adultos (figura 14) (Araújo, 1998), indicam que entre 30-40 dias a expressão da atividade da NADPH-d na árvore dendrítica destes neurônios parece estar com o padrão adulto definido. Por outro lado, os dados da área de campo dendrítico dos neurônios NADPH-d positivos mostrados por Araújo (1998) (figura 14) em ratos adultos recuperados, comparados aos do presente trabalho, indicam que a redução da área de campo dendrítico observada nesses neurônios desaparece na idade adulta quando o déficit nutricional é corrigido.

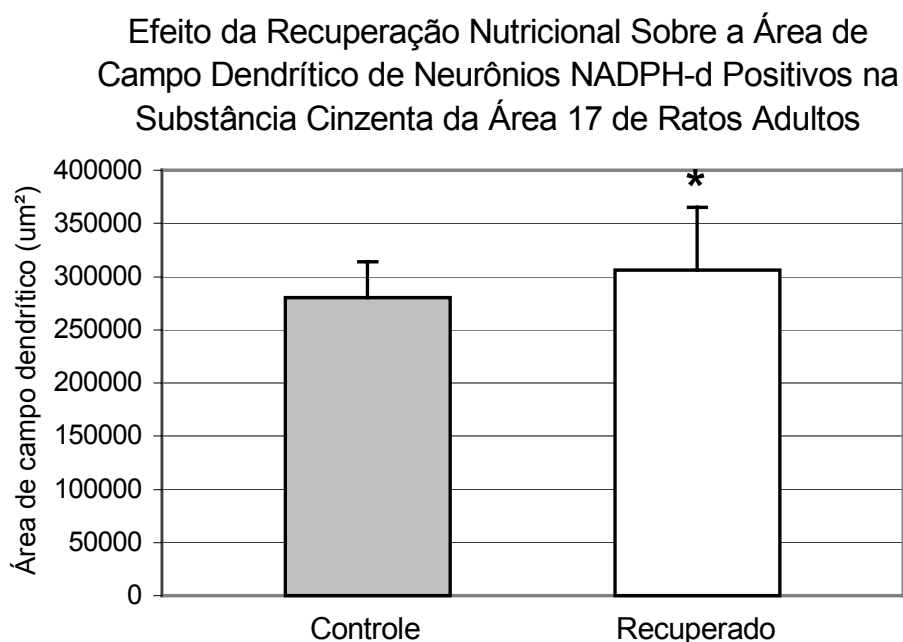


Figura 14 - Áreas de campo dendrítico de neurônios NADPH-d na área 17 de ratos controle (dieta Labina com 22% de proteína) ou desnutridos no início da vida com DBR (dieta com 8% de proteína) e recuperados com Labina a partir dos 42 dias de idade. As áreas foram estimadas a partir dos desenhos em câmara clara de neurônios NADPH-d positivos localizados na SC da área 17. Os valores correspondem as médias  $\pm$  dp. Teste t de Student. \* $P < 0,05$  (Araújo, 1998).

Ao contrário do que vem sendo referido na literatura com relação a outros tipos de agressão, os dados destes dois estudos demonstram que alguns parâmetros dos neurônios NADPH-d positivos são sensíveis à desnutrição crônica imposta no início da vida e que mesmo após recuperação nutricional estas alterações ainda persistem.

Do ponto de vista estrutural, não há dúvidas de que a desnutrição imposta no início da vida repercute sobre vários parâmetros morfológicos dos neurônios NADPH-d positivos localizados na área 17. Além disso, ficou claro que alguns deles, como: área de campo dendrítico, área de corpo celular e segmentos dendríticos de ordens superiores expressando NADPH-d pareceram mais vulneráveis a este tipo de desnutrição. Ao mesmo tempo, permanece incógnita se as alterações arquitetônicas encontradas nos neurônios NADPH-d positivos localizados no córtex visual, resultam em algum efeito funcional para o Sistema Nervoso. Nesse aspecto em particular, Bronzino et al. (1975), estudando a ontogênese da resposta visual evocada em ratos desnutridos durante o desenvolvimento, demonstraram retardo na maturação ontogenética do sistema visual.

A possível relação entre as alterações estruturais no sistema visual do animal desnutrido e eventuais repercussões funcionais, ainda é um campo aberto para investigação científica. Portanto, torna-se relevante que este problema seja experimentalmente investigado. A seguir, o presente estudo apresenta algumas conclusões e perspectivas importantes para estudos futuros nesta área.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados do presente trabalho, pode-se concluir que:

- \* Apesar da dieta qualitativamente deficiente ter sido oferecida durante o período crítico do desenvolvimento, o padrão laminar de atividade da NADPH-d na neurópila cortical não foi alterado;
  
- \* A dieta empregada no presente trabalho alterou a distribuição e a arquitetura dos neurônios NADPH-d positivos localizados na SC da área 17 de ratos, do ponto de vista dos seguintes parâmetros: densidade, número de segmentos dendríticos expressando atividade para NADPH-d, área de campo dendrítico, número de pontos de ramificação e área do corpo celular.

## 7. PERSPECTIVAS

Os estudos acerca dos efeitos promovidos pela desnutrição no Sistema Nervoso têm permitido avanços no campo das neurociências. A histoquímica para NADPH-diaforase, a injeção de traçadores intra ou extracelulares e estudos bioquímicos, são algumas das ferramentas que pretendemos utilizar nas futuras investigações sobre desnutrição e Sistema Nervoso. Por isto algumas perspectivas do presente estudo consistem em:

- \* Investigar a atividade histoquímica da NADPH-d na neurópila e em neurônios localizados em outras regiões cerebrais de ratos submetidos à desnutrição;
- \* Quantificar durante o desenvolvimento a atividade bioquímica da NADPH-d, nas diferentes regiões cerebrais, em ratos submetidos à desnutrição;
- \* Investigar o estado dos axônios no córtex de ratos desnutridos através da injeção intra ou extracelular de traçadores neuronais;
- \* Utilizar técnicas imunohistoquímicas para avaliar a relação dos neurônios NADPH-d positivos com outros neurônios, em ratos submetidos à desnutrição.

## 8. RESUMO



Neste trabalho, foi estudado o impacto da desnutrição crônica desde a gestação sobre parâmetros morfométricos de neurônios NADPH-diaforase (NADPH-d), no córtex visual primário de ratos recém-desmamados. Para isto, foram utilizados 10 animais divididos igualmente em 2 grupos (controle e desnutrido). O grupo controle (n=5) foi alimentado com a dieta de manutenção do biotério (22% de proteína), desde a gestação das mães até 30-40 dias de vida, enquanto o grupo desnutrido recebeu uma dieta multicarenal durante o mesmo período (18% de proteína de origem vegetal). Estes animais eram desmamados aos 25 dias e entre 30 e 40 dias de vida seus cérebros eram perfundidos e cortados em fatias de 200  $\mu\text{m}$ . A reação histoquímica para NADPH-d foi feita de acordo com o protocolo de Scherer-Singler et al.1983. Após a completa marcação dos neurônios e da neurópila a reação era interrompida e os cortes montados em lâminas histológicas. A partir das lâminas, foram desenhados em câmara clara e em um sistema de reconstrução tridimensional, 28 neurônios NADPH-d positivos para o grupo controle e 30 para o grupo desnutrido. O peso corporal do grupo desnutrido apresentou uma redução de 42 e de 57%, ao desmame e à idade experimental respectivamente, comparando-se com o controle. Do mesmo modo, o peso cerebral também sofreu com a desnutrição, porém em menor proporção (15% em relação ao controle). A neurópila apresentou um aspecto similar na atividade histoquímica da NADPH-d em ambos os grupos. Alguns parâmetros bidimensionais como, espessura do córtex na substância cinzenta(1167 $\pm$ 50,7 $\mu\text{m}$  e 1248 $\pm$ 49,5 $\mu\text{m}$ ;  $p<0,01$ ) e área de campo dendrítico (234906 $\pm$ 70806 $\mu\text{m}^2$  e 293681 $\pm$ 73869 $\mu\text{m}^2$ ;  $p<0,01$ ), foram significativamente reduzidos no grupo desnutrido, em relação ao controle. Por outro lado, a densidade de células na área 17 do grupo desnutrido, comparada a do controle, foi maior tanto na substância cinzenta (22 $\pm$ 10 céls/mm $^2$  e 9 $\pm$ 2 céls/mm $^2$ ;  $p<0,01$ ) como na branca(42 $\pm$ 14 e 14 $\pm$ 3 céls./mm $^2$ ;  $p<0,01$ ). Dos parâmetros tridimensionais analisados, encontramos redução na área de corpo celular (113 $\pm$ 37 e 161 $\pm$ 52  $\mu\text{m}^2$ ;  $p<0,05$ ) e no número de pontos de ramificação da árvore dendrítica dos neurônios NADPH-d positivos, dos animais desnutridos em relação aos controles. Encontramos uma similaridade extraordinária no padrão de distribuição dos valores angulares na árvore dendrítica de ambos os grupos. A maior frequência ocorreu na classe equivalente a 0-90 graus. Os resultados indicam que a desnutrição perinatal tem efeitos diferenciados sobre alguns parâmetros morfométricos revelados pela histoquímica da NADPH-diaforase.

## 9. SUMMARY

In this work, it was studied the impact of the early chronic malnutrition on morphometric parameters of NADPH-diaforase (NADPH-d) positive neurons, in the primary visual cortex of young rats. Female albino Wistar rats were placed either on a chow diet (22% of protein) or a multideficient diet (18% of vegetable protein origin), weeks prior to conception and were maintained on these diets during gestation and lactation. The pups of both group continued receiving the same diets from the mother' s gestation up to 30-40 days of life. Ten (10) animals were divided in 2 groups (control (**C**); n=5 and malnourished (**M**); n=5). At weaning (25 days), the pups were weighed and between 30-40 days of life, their brains were perfused and sectioned in slices of 200  $\mu\text{m}$ . The brains slices were processed in agreement to the indirect method of malic enzyme to reveal NADPH-d positive neurons. After the complete labelling of neurons and neuropil, the reaction was interrupted and the slices were mounted on gelatin-coated sheets. Twenty eight (28) NADPH-d positive neurons from **C** group and thirty (30) from the **M** one, were drawn in a camera lucida system and in a tridimensional microscopic system. At weaning and at sacrifice, the body weight of the **M** group, compared to the **C** one, showed a reduction of 42 and of 57%, respectively. In the same way, the cerebral weight also suffered the effects of malnutrition, although in smaller proportion (15% in relation to the control). The neuropil presented a similar pattern of NADPH-d activity in both groups. The thickness of cortical gray matter (**M**-1167+50,7 $\mu\text{m}$  and **C**-1248+49,5 $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,01$ ) and the area of dendritic field (**M**- 234906+70806 $\mu\text{m}^2$  and **C**-293681+73869 $\mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,01$ ), were reduced in **M** rats. On the other hand, the cell density in the primary visual cortex of **M** rats, compared to the control one, were so much greater in the white matter (**M**- 42 $\pm$ 14 céls/ $\text{mm}^2$  and 22 $\pm$ 10 céls/ $\text{mm}^2$ ;  $p < 0,01$ ) than in the grey matter (**C**-14 $\pm$ 3 and 9 $\pm$ 2 céls. /  $\text{mm}^2$ ;  $p < 0,01$ ). Also, we found reduction in the soma area (**M**- 113+37 and **C**-161+52  $\mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,05$ ) and in the number of dendritic tree ramification points of NADPH-d positive neurons, of **M** rats compared to the **C**. The pattern of angular values of the dendritic tree was extraordinary similar in both groups. The largest frequency was in the equivalent class of 0-90 degrees. The results indicate that the early malnutrition has differentiated effects on some of morfometrics parameters revealed by the histochemistry of NADPH-diaforase in the NADPH-d positive neurons.

## 10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, K. N., PRASAD, C. and TANEJA, V. Protein deprivation and the brain: effect on enzymes and free amino acids related to glutamate metabolism in rats. Ann. Nutr. Metab., 25: 228-233, 1981.
- ARAÚJO, M. S. Análise Qualitativa e Quantitativa e Neurônios NADPH-D Positivos no Córtex Visual de Ratos Adultos. Recife, 1998. P. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, 1998.
- AUSTIN, K. B., BROZINO, J. and MORGANE, P. J. Prenatal protein malnutrition affects synaptic potentiation in the dentate gyrus of rats in adulthood. Developmental Brain Research, 29: 267-273, 1986.
- AZZOLIN, I.R.; BERNARD, E.A.; TRINDADE, V.M.; GAMALLO, J.L.G.; PERRY, M.L.S. Effect of protein malnutrition glycoprotein, protein and lipid synthesis in rat cerebellum during the period of brain growth spurt. Annals of Nutrition & Metabolism, 35:82088, 1991.
- BALLABRIGA, A. Malnutrition and the central nervous system. The malnourished child, edited by Robert M. Suskind and Leslie Lewinter Suskind. Nestlé Nutrition Workshop Series. v. 19. Nestec Ltd. Vevey/Raven Press Ltd. New York, 1990.
- BEAL, M.F.; KOWALL, N.W.; ELLISON, D.W.; MAZURER, M.F.; SWARTZ, K.J.; MARTIN, J.B. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. Nature, 321:168, 1986.
- BEAL, M.F.; KOWALL, N.W.; SWARTZ, K.J.; FERRANTE, R.J. Homocysteic acid lesion in rat striatum spare somatostatin-neuropeptide Y (NADPH-diaphorase) neurons. Neurosci. Letters, 108:36-42, 1990.
- BEDI, K.S.; MASSEY, R.F. and SMART, J.L. Neuronal and synaptic measurements in the visual cortex of adult rats after undernutrition during normal or artificial rearing. J. Comp. Neurol., 289:89-98, 1989.
- BEDI, K.S. & BHIDE, P.G. Effects of environmental diversity on brain morphology. Early Hum. Dev., 17:107-143,1988.
- BEDI, D.S. & WARREN, M. A. The effects of undernutrition during early life on the rat optic nerve fiber number and size-frequency distribution. J. Comp. Neurol., 219:125-132, 1983.
- BENTON, J. W.; MOSER, H. W.; DODGE, P. R. and CARR, S. Modification of the schedule of myelination in the rat by early nutritional deprivation. Pediatrics, v.38,n.5, p.801-807, Nov. 1966.
- BOHME, G.A.; BON, C.; STUTZMANN, J-M.; DOBLE, A.; BLANCHARD, J-C. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. Eur. J. of Pharm., 199:379-381, 1991.

- BREDT, D.S.; HWANG, P.M. and SNYDER, S.H. Localisation of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. Nature, 347:768-770, 1990.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. Neuron, 8:3-11, 1992.
- BROCK, J.W. and PRASAD, C. Alterations in dendritic spine density in the rat brain associated with protein malnutrition. Developmental Brain Research, 66; 266-269, 1992.
- BRONZIMO, J. D.; MORGANE, P. J.; FORBES, W. B.; STERN, W. C. AND RESNICK, O. Ontogeny of visual evoked responses in rats protein-malnourished during development. Biological Psychiatry, v. 10, n. 2, p.175-184, 1975.
- BROWN, J. LARRY & POLLITT, ERNESTO. Malnutrition, poverty and intellectual development. Research into childhood nutrition reveals that a poor diet influences mental development in more ways than expected. Other aspects of poverty exacerbate the effects. Scientific American, p. 38-43, Feb. 1996.
- CHEN, J-C; TONKISS, J., GALLER, J.R. & VOLICER, L. Prenatal protein malnutrition in rats enhances serotonin release from hippocampus. J. Nutr., 122-2138-2143, 1992.
- COLOMBO, J.P.; CERVANTES, H.; KOKOROVIC, M.; PFISTER, V.; PERRITAZ, R. Effects of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in the rat. Annals of Nutr. and Met., 36:23-33, 1992.
- COSTA, E.T.; NASCIMENTO, J.L.M. DO; PICANÇO-DINIZ, C.W.; QUARESMA, J.A.S. and SILVA-FILHO, M. Histochemical characterization of NADPH-diaphorase activity in area 17 of diurnal and nocturnal primates and rodents. Brazilian J. of Med. and Biol. Res., 29: 1355-1362, 1996.
- COUTINHO, E.M. Relações hospedeiro-parasita na esquistossomose mansônica, em função da dieta básica regional. Recife, 1976. 109p. Tese (Livre Docência)-Universidade Federal de Pernambuco, 1976.
- CRAGG, B.G. The development of cortical synapses during starvation in the rat. Brain, 95:143-150,1972.
- DASTUR, D.K.; DEWAN,A.; MANGHANI, D.K.; UDANI, P.M. Quantitative histology of nerve in protein-calorie malnutrition and well nourished children. Neuropathology and applied Neurobiology, 23:405-422, 1977.
- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; BARTLEY, D.A.; UHL, G.R.; SNYDER, S.H. Mechanisms of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. J. Neurosci., 13:2651-2661, 1993.

- DEBASSIO, W. A. & KEMPER, T. L. The effects of protein deprivation on neuronal migration in rats. Develop. Brain Res., 20: 191-196, 1985.
- DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; ORTEGA, A.; KEMPER, T.; MORGANE, P.J. Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of the visual cortex in rats of three age groups. The J. of Comp. Neur., 292:117-126, 1990.
- DO NASCIMENTO, R.S.V. Estudo das colunas de dominância ocular do *Cebus apella* pela histoquímica da NADPH-diaforase. Belém, 1995. 131p. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Pará, 1995.
- DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain, in: Applied Neurochemistry (A.N. Davison and J. Dobbing, cols.), F.A. Davis, Philadelphia, pp. 287-316, 1968.
- DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain: the relevance of animal models to the human problem. Am. J. Dis. Child., 20:411-415, 1970.
- DOBBING, J.; HOPEWELL, J.W. and LYNCH, A. Vulnerability of developing brain. VII. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. Exp. Neurol., 32:439-447, 1971.
- DOBBING, J. Vulnerable periods of brain development, in: Lipids, Malnutrition and the Developing Brain, CIBA Foundation Symposium, Elsevier, Amsterdam, pp.9-29, 1972.
- EKHERT, C.; BARNES, R.H.; LEVITSKY, D. A. The effect of protein-energy undernutrition induced during the period of suckling on cholinergic enzyme activity in the rat brain system. Brain Research, 101:372-377, 1976.
- ELPHICK, M.R. Methods in Molecular Biology, vol.72: Neurotransmitter Methods. Edited by: R.C. Rayne Humana Press Inc. Totowa, NJ, 1997.
- FARO, L. R. Localização da atividade da NADPH-diaforase na área 17 do córtex visual humano. Belém, 1997. 120 p. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Pará, 1997.
- FERÁNDEZ, V.; PASCUAL, R.; RUÍZ, S. Early life environmental deterioration, nutrition and ontogenesis of the motor cortex in the rat: a Golgi study. Biol Neonate. 64:245-253, 1993.
- FERRANTE, R.J.; KOWAL, N.W.; BEAL, M.F.; RICHARDSON, E.D.; BIRD, E.D.; MARTIN, J.B. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. Science, 230:561-563, 1985.
- FERRIERO, D.M.; ARCAVI, L.J.; SAGAR, S.M.; MSINTOSH, T.K.; SIMON, R.P. Selective sparing of NADPH-diaforase neurons in neonatal hypoxia-ischemia. Ann. Neurol., 24:670-676, 1988.

- FRIEDLANDER, M.J.; MONTAGUE, P. R.; HESTER, F.; MARCHASE, R. B. Role of nitric oxide in NMDA-receptor mediated release of neurotransmitter in visual cortex. Society for Neuroscience Abstracts 18,21, 1992.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 288: 373-376, 1980.
- GABBOTT, P. L. A. & BACON, S. J. Co-localisation of NADPH-diaphorase activity and GABA immunoreactivity in local circuit neurones in the medial prefrontal cortex (mPFC) of the rat. Brain Research 699:321-328, 1995.
- GAMBETTI, P.L.A; IZZUTO, N.N.; SHAFER, B.; PFAFF, L. Synapses and malnutrition: quantitative ultrastructural study of rat cerebral cortex. Experimental neurology, 43: 464-473, 1974.
- GARCIA-RUIZ, M.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L. and CORKIDI, G. Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. Brain Research, 625:203-212, 1993.
- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L. and CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature, 336:385-388, 1988.
- GOLUB, M.S.; GERSHWIN, M.E. and VIJAYAN, V.K. Passive avoidance performance of mice fed marginally or severely zinc deficient diets during post-embryonic brain development. Physiol. Behav. 30:409-413, 1983.
- GUEDES, R.C.A.; CABRAL-FILHO, J.E. and TEODÓSIO, N.R. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and malnourished rats. In: Spreading Depression (Do Carmo, R.J., ed.) pp 17-26. Springer, Berlin, Germany, 1992.
- GUNDAPPA, G. & DESIRAJU, T. Deviations in brain development of F2 generation on caloric undernutrition and scope of their prevention by rehabilitation: Alterations in dendritic spine production and pruning of pyramidal neurons of lower laminae of motor cortex and visual cortex. Brain Res., 456:205-223, 1988.
- HEVNER, R.F.; LIV, S. and WONG-RILEY, T.T. A metabolic map of cytochrome oxidase in the rat brain: Histochemical, densitometric and biochemical studies. Neuroscience, 65: 313-342, 1995.
- HOPE, B.T.; MICHAEL, G.J.; KNIGGE, K.M.;VINCENT, S.R. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., 88:2811-2814, 1991.



- HUANG, Z.; HUANG, P.L.; DANAHIAN, N.; DALKARA, T.; FISHMAN, M.C. and MOSKOWITZ, M.A. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. Science, 265:1883-1885, 1994.
- IENTILE, R.; PICCIURRO, V.; PEDALE, S.; NUCCI, C.; MALECKA, B.; NISTICÒ, G.; MACAIONE, S. Nitric oxide enhances amino acid release from immature chick embryo retina. Neuroscience Letters, 219:79-82, 1996.
- IZUMI, Y.; CLIFFORD, D.B.; ZORUMSKI, C.F. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. Science, 257:1273-1226, 1992.
- KIMURA, F. & BAUGGHMAN, R. W. GABAergic transcallosal neurons in developing rat neocortex. Eur. Journ. of Neuroscien., 9: 1137-1143, 1997.
- KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5159-5162, 1989.
- KOWAL, N.W. & BEAL, M.F. Cortical somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH diaphorase neurones: normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. Ann. Neurol., 23: 105-114, 1988.
- KUO, H.; HENEMIHLE, J. and INGRAM, D.K. Nitric oxide synthase in rat brain: age comparisons quantitated with NADPH-diaphorase histochemistry. J. of Geront., 52A(3); B146-B151, 1997.
- LEUBA, G. & RABINOWICZ, T. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. I. Cellular densities, cortical volume and total number of cells. Exp. Brain. Res., 37:283-298, 1979a.
- LEUBA, G. & RABINOWICZ, T. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. II. Evaluation of dendritic branching and spines in the visual region. Exp. Brain Res., 37:299-308, 1979b.
- LEVITSKY, D.A. & STRUPP, B.J. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. J. Nutr., 125:2212S-2220S, 1995.
- MARÍN, M.C.; TOMÁS, M.E.DE; SERRES, C. and MERCURI, O. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. J.Nutr. 125: 1017-1024, 1995.
- MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.; WISHNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry, 27:8706-8711, 1988.

- MARÍN, M.C.; DE TOMÁS, M.E.; SERRES, C.; MERCURI, O.(1995). Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. J. Nutr., 125:1017-1024.
- MATSUMOTO, T.; NAKANE, M.; POLLOCK, J.S.; KUK, J.E.; FÖSTERMANN, U. A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH diaphorase is only seen after exposure of the tissue to fixative. Neurosci. Lett., 155:61-64, 1993.
- MENEDEZ-PATTERSON, A.; MARIN, B.; SAINT-REMY, A.; TASCÓN, B.; APARICIO, J.; FERNANDEZ, S. Long-term effects of early undernutrition on growth and biochemical parameters in male rats. Nutrition Reports International, v.35,3:539-549, 1987.
- MONTEIRO, J.S. Desnutrição, Estimulação Ambiental e Desenvolvimento do Sistema Nervoso: Um Estudo Eletrofisiológico. Recife, 1995. 86p. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, 1995.
- MORGANE, P.J., MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, R.; HALL, H.; BRONZINO, J.D.; KISSANE, J.; HAWRYLEWICS, E.; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. Neurosci. Biobehav. Rev., 2:137-230, 1978.
- MORGANE, P.J.; AUSTIN-LA FRANCE, R.; BRONZINO, J.D.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Malnutrition and developing central nervous system. In: ISAACSON, R.L.; JENSEN, K.F. (ed). The vulnerable Brain and Enviromental Risks. New York, Plenum Press p.2-42, 1992.
- MORGANE, P.J.; AUSTIN-LA FRANCE, R.; BRONZINO, J.D.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. Neurosc. Biobehav. Rev., 17:91-128, 1993.
- NAKAMURA, T.; YAMADA, K.; HASEGAWA, T.; NABESHIMA, T. Possible involvement of nitric oxide in quinolic acid-induced convulsion in mice. Pharmacol. Biochem. Behav., 51:309-312, 1995.
- NOWICKI, J.P.; DUVAL, D.; POIGNET, H.; SCATTON, B. Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. Eur. J. Pharmacol., 204:339-340, 1991.
- PÉREZ, S.E.; ADRIO, F.; RODRÍGUEZ, M.A.; RODRÍGUEZ-MOLDES, I.; ANADÓN, R. NADPH-diaphorase histochemistry reveals oligodendrocytes in the rainbow trout (teleosts). Neurosci. Lett. 205:83-86, 1996.
- PETERS, A & JONES, E. G. Cerebral Cortex. Vol. 3: Visual Cortex: Peters A. Plenum Press, New York and London p. 19-79, 1985.

- PICANÇO-DINIZ, C.W.; SILVEIRA, L.C.L.; YAMADA, E.S. and MARTIN, K.A.C. Biocytin as a retrograde tracer in the mammalian visual system. Braz. J. of Med. and Biolog. Research, 25: 57-62, 1992.
- PINE, AP. & JESSOP, N.S. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. Brit. J. of Nutr. 71: 13-27, 1994.
- QUIRK, G.J.; MEJÍA, W.R.; HESSE, H.; SU, H. Early malnutrition followed by nutritional restoration lowers the conduction velocity and excitability of the corticospinal tract. Brain Res., 670:277-282, 1995.
- RABIN, O.; LEFAUCONNIER, J-M.; CHANEZ, C.; BERNARD, G.; BOURRE, J-M. Developmental effects of intrauterine growth retardation on cerebral amino acid transport. Pediatr. Res., 35:640-648, 1994.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H. and FAHEY, G.J. AIN-93 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., 123:1939-1951, 1993.
- RESNICK, O.; MILLER, M.; FORBES, W.; HALL, R.; KEMPER, T.; BRONZINO, J.; MORGANE, J.P. Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. Neurosci. Biobehav. Rev., v.3,4:233-246, 1979.
- ROOT, E.J.; KIRTEPATRICK, J.; RUTTER, M.A.; WIGAL, M.T.; LONGEHECKER, J.B. Dendritic and behavioral changes following subclinical nutrient deficiencies in the cat. Nutr. Reports International, v.37,5:959-972, 1988.
- ROYLAND, J.; KLINKHACHORN, P.; KONAT, G. and WIGGINS, R.C. How much undernourishment is required to retard brain myelin development. Neurochem. Int., 21:269-274, 1992.
- SALAS, M.; DIAZ, S. and NIETO, A. Effects of neonatal food deprivation on cortical spines and dendritic development of the rat. Brain Res., 73:139-144, 1974.
- SANDELL, J.H. NADPH diaphorase histochemistry in the macaque striate cortex. J.Comp. Neurol., 251:388-397, 1986.
- SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S.R.; KIMURA, H.; McGEER, E.G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH diaphorase histochemistry. J. Neurosc. Methods, 9:229-234, 1983.
- SCHUMAN, E.M. & MADISON, D.V. A requirement for the intracellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. Science, 254:1503-1506, 1991.

- SCHUMAN, E.M. & MADISON, D.V. Nitric oxide and synaptic function. Annu. Rev. Neurosc., 17:153-183, 1994.
- SNYDER, S. H. Nitric oxide and neurons. Current opinion in Neurobiology, 2:323-327, 1992.
- SPESSERT, R. & LAYES, E. Fixation conditions affect the intensity but not the pattern of NADPH-diaphorase staining as a marker for neuronal nitric oxide synthase in rat olfactory bulb. J. Histochem. Cytochem., 42:1309-1315, 1994.
- SPOERRI, P. E.; SRIVASTAVA, N. and VERNADAKIS, A. Ethanol neurotoxicity on neuroblast-enriched cultures from three-day-old chick embryo is attenuated by the neurotrophic action of GABA. Int. J. Devl. Neuroscience, 13 (6): 539-544, 1995.
- SUGITA, N. Comparative Studies on the growth of the cerebral cortex. VII. On the influence of starvation at an early age upon the development of the cerebral cortex: albino rat. J. Comp. Neurol., 29:177-240, 1918.
- TEODÓSIO, N.R.; VARELA, R.M.; BION, F.M.; SIQUEIRA CAMPOS, F.A.C.; LIRA, R.A.B.; FLORES, H.(1981). Protein deficiency and calorie deficiency in etiology of early malnutrition in rats. In: International congress of nutrition, XII, San Diego, Proceedings, Abstract n.1013, 1981.
- TEODÓSIO, N.R.; LAGO, E.S.; ROMANI, S.A; GUEDES, R.C.A. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. Archiv. Latin. de Nutric.40(4): 533-547, 1990.
- THOMAS, E. & PEARSE, A.G.E. The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. Histochemie, 2:266-282, 1961.
- UEMURA, Y.; KOWAL, N.W. & BEAL, M.F. Selective sparing of NADPH-diaphorase somatostatin striatum. Ann. Neurol., 27:620-625, 1990.
- VALTSCHANOFF, J. G.; WEINBERG, R. J.; KHARAZIA, V. N.; SCHIMIDT, H. H. H. W.; NAKANE, M. and AND RUSTIONI, A. Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry, and colocalization with GABA. Neuroscience Letters, 157: 157-161, 1993.
- VENABLE, N.; FERNANDEZ, V.; DIAZ, E.; PINTO-HAMUY, T. Effects of preweaning environmental enrichment on basilar dendrites of pyramidal neurons in occipital cortex: a Golgi Study. Develop. Brain Res., 49:140-144, 1989.
- VINCENT, S.R. & KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. Neuroscience, 46:755-784, 1992.

- WIGGINS, R.C.; FULLER, G.N.; BRIZZEE, L.; BISSEL, AC. and SAMORAJSKI, T. Myelination of the rat optic nerve during postnatal undernourishment and recovery: a morphometric analysis. Brain Res., 308:263-272, 1984.
- WINICK, M. & NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. J. Nutr., 89:300-306, 1966.
- WOOLF, N.J.; JACOBS, R.W. and BUTCHER, L.L. The pontomesencephalo tegmental cholinergic system does not degenerate in Alzheimer's disease. Neuroscience Letters, 96:277-282, 1989.
- XIAO, YUE-MEI; DIAO, YUN-CHENG and SO, KWOK-FAI. A morphological study of neurons expressing NADPH diaphorase activity in the visual cortex of the golden hamster. Brain, Behav. And Evol., 48:221-230, 1996.
- XIE, X. & SMART, T.G. A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission. Reprinted from Nature, 349:521-524, 1991.
- YAMASHITA, M. & FUKUDA, Y. Calcium channels and GABA receptors in the early embryonic chick retina. Journal of Neurobiology, 24(12): 1600-1614, 1993.
- YAN, X.X., GAREY, L.J. & JEN, L.S. Development of NADPH-diaphorase activity in rat neocortex. Developmental Brain Res., 79:29-38, 1994.