

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
Área de Concentração: Neurociências

Efeitos do ambiente enriquecido na morfometria hipocampal em ratos submetidos a crises convulsivas e a desnutrição no período neonatal.

Paula Steffen Alvarez

Orientadora: Prof. Dra. Magda Lahorgue Nunes

Co-Orientadores: Dr. Fabrício Simão e Dra. Marta Hemb

Porto Alegre 2013

Paula Steffen Alvarez

Efeitos do ambiente enriquecido na morfometria hipocampal em ratos submetidos a crises convulsivas e a desnutrição no período neonatal.

Orientadora: Prof. Dra. Magda Lahorgue Nunes

Co-Orientadores: Dr. Fabrício Simão e Dra. Marta Hemb

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Medicina e ciências da saúde, área de concentração em neurociências.

Porto Alegre 2013

PAULA STEFFEN ALVAREZ

**EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NA MORFOMETRIA HIPOCAMPAL EM RATOS
SUBMETIDOS À CRISES CONVULSIVAS E DESNUTRIÇÃO NO PERÍODO NEONATAL.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Medicina e ciências da saúde, área de concentração em neurociências.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Nadja Schroder

Dr. Fulvio Scorza

Dr. Vinícius Duval

Dr. Ramón Hypólito

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Magda Lahorgue Nunes pela oportunidade de executar este projeto contribuindo para o meu crescimento e desenvolvimento profissional. Pelo suporte científico, pelo exemplo profissional, pela amizade e carinho.

À minha co-orientadora, Dra. Marta Hemb pelo incentivo e por me fazer acreditar que seria possível desenvolver este projeto. Por escutar minhas angústias frente ao mundo novo que conheci durante a realização da minha pesquisa. Pelos conhecimentos e ensinamentos científicos e em especial pelo carinho e amizade.

Ao meu co-orientador, Dr. Fabrício Simão, pelo apoio, pelo suporte científico, pelo exemplo de conhecimento em pesquisa experimental e sobre tudo pela amizade e dedicação.

Ao querido professor Léder Xavier pela fundamental ajuda e disponibilidade em ensinar, sempre com bom humor e paciência por às vezes estar falando “com uma selvagem”.

Aos queridos colegas do Laboratório de Neurociências, em especial à Simone Salamoni, Zuzete Pires, Ricardo Breda e Daniela Abreu pelo apoio essencial e convívio sempre agradável.

Aos queridos amigos do Laboratório de Neurociências, Gabriele Zanirati, Pamella Azevedo, Caroline Calice, Samuel Greggio, Gianina Venturin pelos momentos de descontração, risadas, trocas de conhecimentos e trocas afetivas. Aos bolsistas Felipe, André e Dani pela disponibilidade e ajuda durante a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Mário Wagner, pela disponibilidade, pelos ensinamentos e auxílio na análise estatística.

À Capes, por financiar minha pós-graduação.

Ao meu irmão Gustavo, pela amizade e amor.

À minha família, pelo incentivo constante.

LISTA DE ABREVIATURAS

AE: Ambiente Enriquecido

CA1: Corno de Amon 1

CA3: Corno de Amon 3

CC: Crise Convulsiva

D: Desnutrido

D + AE: Desnutrido com ambiente enriquecido

D + CC: Desnutrido com crise convulsiva

D + CC + AE: Desnutrido com crise convulsiva e ambiente enriquecido

N: Nutrido

N + AE: Nutrido com ambiente enriquecido

N + CC: Nutrido com crise convulsiva

N + CC + AE: Nutrido com crise convulsiva e ambiente enriquecido

OMS: Organização mundial de Saúde

RN: Reabilitação Nutricional

SE: Status Epilepticus

SNC: Sistema Nervoso Central

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Volumetria do hipocampo e o efeito da nutrição (N), desnutrição (D), crises convulsivas (CC) e ambiente enriquecido (AE).....36
- Tabela 2** Médias dos valores de volumetria do hipocampo.....36
- Tabela 3** Densidade neuronal na região de CA1 do hipocampo e o efeito da nutrição (N), desnutrição (D), crises convulsivas (CC) e ambiente enriquecido (AE).....38
- Tabela 4** Médias dos valores de densidade neuronal na região de CA1 do hipocampo.....39
- Tabela 5** Densidade neuronal na região de CA3 do hipocampo e o efeito da nutrição (N), desnutrição (D), crises convulsivas (CC), ambiente enriquecido (AE).....43
- Tabela 6** Médias dos valores de densidade neuronal na região de CA3 do hipocampo.....43
- Tabela 7** Densidade glial na região de CA1 do hipocampo e o efeito da nutrição (N), desnutrição (D), crises convulsivas (CC), ambiente enriquecido (AE).....47
- Tabela 8** Médias dos valores de densidade glial na região de CA1 do hipocampo.....47
- Tabela 9** Densidade glial na região de CA3 do hipocampo e o efeito da nutrição (N), desnutrição (D), crises convulsivas (CC), ambiente enriquecido (AE).....49
- Tabela 10** Médias dos valores de densidade glial na região de CA3 do hipocampo.....50
- Tabela 11** Espessura na região de CA1 do hipocampo e o efeito da nutrição (N), desnutrição (D), crises convulsivas (CC), ambiente enriquecido (AE).....52

Tabela 12 Médias dos valores de espessura na região de CA1 do hipocampo.....53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hipocampo de um rato adulto e suas subregiões.....	21
Figura 2 Efeitos sensoriais, cognitivos, motores e sociais da exposição de ratos ao ambiente enriquecido.....	23
Figura 3 Comparação dos tamanhos de um rato nutrido e um desnutrido da mesma idade.....	29
Figura 4 Modelo de câmara vedada para experimentos com flurotil.....	30
Figura 5 Modelo de Ambiente Enriquecido.....	31
Figura 6 Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de volumetria do hipocampo....	32
Figura 7 Fluxograma de valores médios para volume do hipocampo.....	35
Figura 8 Metodologia utilizada para calcular a volumetria do hipocampo.....	37
Figura 9 Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de densidade neuronal na região de CA1 do hipocampo.....	38
Figura 10 Fluxograma de valores médios para densidade neuronal na região de CA1.....	40
Figura 11 Amostra da densidade neuronal na região de CA1.....	41
Figura 12 Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de densidade neuronal na região de CA3 do hipocampo.....	42

Figura 13 Fluxograma de valores médios para densidade neuronal na região de CA3.....	44
Figura 14 Amostra da densidade neuronal na região de CA3.....	45
Figura 15 Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de densidade glial na região de CA1 do hipocampo.....	46
Figura 16 Fluxograma de valores médios para densidade glial na região de CA1.....	48
Figura 17 Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de densidade glial na região de CA3 do hipocampo.....	49
Figura 18 Fluxograma de valores médios para densidade glial na região de CA3.....	51
Figura 19 Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de espessura na região de CA1 do hipocampo segundo os grupos estudados.....	52
Figura 20 Fluxograma de valores médios para Espessura de CA1.....	54
Figura 21 Amostra da espessura da região de CA1.....	55

RESUMO

Introdução: Recentemente mostrou-se que o enriquecimento ambiental promove significativa melhora na aprendizagem e retenção de memória visual-espacial, sendo capaz de reverter a disfunção cognitiva gerada por subnutrição e crises convulsivas. Considerando o papel do hipocampo na memória/aprendizagem, investigamos os efeitos do ambiente enriquecido sobre a morfometria do hipocampo de ratos submetidos a crises recorrentes e desnutrição no período neonatal.

Métodos: Filhotes machos de ratos Wistar foram alocados em 8 grupos: Nutridos Controles (N), Nutridos com Crise Convulsiva (N+CC), Nutridos com Ambiente Enriquecido (N+AE); Nutridos com Crises convulsiva e Ambiente Enriquecido (N+CC+AE), Desnutridos Controles (D), Desnutridos com Crise Convulsiva (D+CC), Desnutridos com Ambiente Enriquecido (D+AE); Desnutridos com Crises convulsiva e Ambiente Enriquecido (N+CC+AE). Os animais dos grupo desnutridos foram mantidos em um regime de privação alimentar progressivo por afastamento da fêmea nutriz do segundo (P2) ao décimo quinto (P15), aumentando 2 horas por dia até totalizar 12 horas, período máximo que foi mantido o afastamento até o fim da desnutrição. Entre P8 e P10, os grupos com crises convulsivas foram expostos diariamente a três crises recorrentes induzidas por flurotil. Entre P21 e P51 os animais dos com ambiente enriquecido foram expostos ao mesmo. Em P51 todos animais foram sacrificados por perfusão Transcardíaca. Foi avaliado o volume do Hipocampo através da metodologia de grade de pontos. As densidades neuronais e gliais nas subregiões CA1 e CA3 e a espessura da subregião CA1 foram calculadas a partir do sistema quantitativo bidimensional, por teste de pontos criado pelo software Image Pro Plus 6.0 (Capture Media Cybernetics, USA).

Resultados: A desnutrição durante o desenvolvimento inicial reduziu a densidade neuronal nos subregiões CA1 e CA3, bem como promoveu uma diminuição na densidade de células gliais em CA1. Em paralelo, as crises convulsivas promoveram uma diminuição na densidade de células gliais em CA1 e CA3. Os animais submetidos ao ambiente enriquecido apresentaram um aumento de volume do hipocampo e da espessura da camada de CA1.

Conclusões: Os achados do presente estudo sugerem que a estimulação ambiental no início da vida pode desempenhar um papel fundamental na melhoria do desenvolvimento estrutural do cérebro e, conseqüentemente, do seu funcionamento cognitivo.

Descritores: desnutrição, Epilepsia, crises convulsivas, ambiente enriquecido, hipocampo, morfometria

ABSTRACT

Introduction: It has been recently shown that enriched environment leads to a significant benefit in learning and retention of visual-spatial memory, being able to reverse the cognitive impairment generated by undernourishment and seizures. Considering the role of the hippocampus in memory/learning, we investigated the effects of the enriched environment on hippocampal morphometry of rats submitted to recurrent seizures and undernourishment in the neonatal period.

Methods: Male offspring of rats were allocated on 8 experimental groups Nourished controls (N), Nourished with Recurrent Seizures (N + RS), Nourished with Enriched Environment (N + EE); Nourished with Recurrent Seizures and Enriched Environment (N + RS + EE), Undernourished Controls (U), Undernourished with Convulsive Crisis (U + CC), Undernourished with Enriched Environment (U + EE); Undernourished with Recurrent Seizures and Enriched Environment (U + RS + EE). Undernourished groups were maintained on a regimen of food deprivation by progressive removal of the second lactating female (P2) to the fifteenth (P15), an increase of 2 hours a day up to a total 12 hours, which was kept maximum spacing until end undernourishment. Between P8 and P10, groups with recurrent Seizures were exposed to three recurrent seizures per day induced by flurothyl. Between P21 and P51 all animals with an enriched environment were exposed to it. At P51 all animals were sacrificed by transcardiac perfusion. We evaluated the volume of the hippocampus using the grid points methodology. Neuronal and glial densities, hippocampal volume and CA1 subfield thickness were calculated based on the two-dimensional quantitative system for test points created by Image Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics Capture, USA).

Results: Undernourishment during early development decreased neuronal density in the CA1 and CA3 subfield, as well as in the glial density in CA1 subfield. In parallel, recurrent seizures promoted a decrease in the glial density in CA1 and CA3 area. The animals submitted to the enriched environment show an increased hippocampal volume and thickness of layer of CA1.

Conclusions: Pathological findings, with onset in the early stages of undernourishment and epilepsy may be a significant factor in comorbidities, such as cognitive dysfunction found in patients with epilepsy and malnutrition. Taking these findings together, we can assume that environment stimulation beginning early in life may play a critical role in improving the structural brain development and hence cognitive functioning

Keywords: undernourishment, epilepsy, recurrent seizures, enriched environment, hippocampus, morphometry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Desnutrição.....	15
1.2 Desnutrição, Crises Convulsivas e Epilepsia	17
1.3 Hipocampo.....	20
1.4 Enriquecimento Ambiental	21
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Geral.....	25
2.2 Específicos	25
3 METODOLOGIA	26
3.1 Esquema dos experimentos.....	26
3.1.1 Descrição dos grupos	26
3.2 Paradigma da Desnutrição.....	28
3.3 Modelos de Crises	29
3.4 Modelo de enriquecimento ambiental	30
3.5 Protocolo de inclusão de encéfalos para avaliação da Morfometria e Histologia do Hipocampo.....	31
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Volume do Hipocampo.....	35
5.2 Densidade Neuronal na região de CA1.....	37
5.3 Densidade neuronal na região de CA3	42
5.4 Densidade Glial na região de CA1.....	466
5.5 Densidade Glial na região de CA3.....	488
5.6 Espessura de CA1.....	511

6 DISCUSSÃO	566
CONCLUSÕES	633
REFERÊNCIAS.....	644
ANEXOS	Erro! Indicador não definido.1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desnutrição

A desnutrição, conforme definição da Organização Mundial da Saúde compreende uma variedade de condições patológicas, decorrentes de deficiências de energia e proteínas em variadas proporções, que atingem preferencialmente as crianças, sempre agravada pelas infecções repetidas (Mello 2005). No mundo há milhões de pessoas que sofrem de desnutrição. Os países em desenvolvimento abrigam quase a totalidade dos casos de desnutrição mundial (Mello 2005), sendo responsável por 35% dos casos de morte em crianças nos países em desenvolvimento a cada ano. As crianças com desnutrição também enfrentam maior risco de morbidade por doenças infecciosas e retardo no desenvolvimento físico e cognitivo (Black et al 2008).

O desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) segue uma ordem linear e precisa. Na espécie humana, o período crítico de aceleração do crescimento cerebral estende-se da trigésima semana de gestação até o final do segundo ano de vida. Durante este período, apesar da plasticidade neuronal também ser máxima, danos severos podem acarretar alterações permanentes. O estado nutricional é provavelmente o fator ambiental mais importante capaz de influenciar no desenvolvimento do SNC (Morgane et al 1993). A desnutrição nos estágios iniciais da vida leva a consequências persistentes no desenvolvimento e posterior maturação do SNC, acarretando em danos no aprendizado e no comportamento que persistem até a vida adulta do indivíduo (Almeida et al 2002). A desnutrição materno-infantil é uma das principais causas responsáveis pelo alto índice de mortalidade infantil ainda registrado no nosso país.

Crianças desnutridas estão expostas a deficiências do sistema imunológico, maior risco de infecção, e aumento na predisposição para atrasos no desenvolvimento neuropsicomotor (Black et al 2008). Milhões de crianças que crescem em países em desenvolvimento sofrem de fome (Victora et al 2008). A desnutrição na infância pode

acarretar efeitos a longo prazo tanto na saúde física quando no desempenho escolar e de trabalho. Estes efeitos se agravam ainda mais se a subnutrição tem início ainda no período intra-uterino (Bryce et al 2008). Em decorrência da fome, milhões de crianças não conseguem atingir todo o seu potencial pleno de desenvolvimento neuropsicomotor no futuro (Grantham-McGregor et al 2007).

Existem muitas evidências de que a desnutrição materna pode provocar um crescimento deficiente do feto bem como provocar a diminuição da população celular, especialmente no que diz respeito ao sistema nervoso central (SNC) (Kramer & Kakuma 2003). A prematuridade é um evento muito comum no nosso meio. Crianças prematuras apresentam um risco maior de déficits de desenvolvimento do que crianças nascidas a termo (Manacero et al 2012). Em estudos experimentais observou-se que a desnutrição aliada à prematuridade é responsável por alterações fisiológicas e morfológicas graves do SNC (Florian & Nunes 2011). Em roedores, observa-se que a desnutrição provoca alterações na liberação de neurotransmissores bem como a diminuição do tamanho do cérebro (Rotta et al 2003).

A desnutrição precoce pode acarretar em diversas alterações comportamentais, cognitivas, fisiológicas e morfológicas do SNC em desenvolvimento. Observam-se ainda alterações metabólicas como diabetes e alterações somáticas (Akman et al 2004; Florian & Nunes 2011; Hoffmann et al 2004; Huang et al 2003; Samlowski et al 1998). A desnutrição persistente por períodos moderados a severos antes dos dois primeiros anos de vida, pode estar associada a atraso no desenvolvimento cognitivo e desempenho escolar em crianças (Hall et al 2001).

Estudos experimentais buscam verificar amplamente o possível efeito da desnutrição sobre o SNC. O estágio vital onde a desnutrição ocorre é determinante sobre os possíveis danos estruturais e comportamentais (Dobbing et al 1971). Os primeiros estudos experimentais sobre nutrição e SNC em desenvolvimento datam da década de 60, e demonstravam uma significativa redução do peso cerebral de ratos subnutridos. Desde esta época, os pesquisadores concluíram que o cérebro dos mamíferos é mais vulnerável aos

efeitos da restrição nutricional no período de maior aceleração do crescimento cerebral (Dobbing & Sands 1981). Em seres humanos, o período de maior vulnerabilidade do SNC ocorre desde o segundo trimestre gestacional até o segundo ano de vida (Morgane et al 1993). Em roedores, o SNC é mais vulnerável desde o nascimento até a terceira semana de vida, quando ocorre o desenvolvimento do hipocampo e cerebelo desses animais (Morgane et al 1993).

Em estudos experimentais, observa-se que a desnutrição precoce reduz marcadamente o peso corporal e cerebral dos animais e, esta redução, permanece mesmo após recuperação nutricional (Nunes et al 2002). Diversos paradigmas de desnutrição são encontrados na literatura sendo o paradigma de restrição alimentar pelo afastamento materno durante o período de lactação, dietas hipoprotéicas e dietas com baixo teor de aminoácidos os mais utilizados (Bronzino et al 1990; Bronzino et al 1986; Palencia et al 1996; Taber et al 1980).

Experimentalmente diversos pesquisadores descreveram alterações cerebrais secundárias à desnutrição. Primeiramente foi observada redução da espessura de áreas corticais (Dobbing et al 1971). Leuba & Rabinowicz (Leuba & Rabinowicz 1979), entretanto, não observaram alteração no número total de neurônios. Posteriormente, com o avanço das técnicas histológicas, foi demonstrado haver alterações significativas na morfologia, com redução da largura das células piramidais corticais (Levitsky & Strupp 1995), bem como redução na densidade das espinhas dendríticas do córtex (Sankar et al 1998), e déficits dos neurônios granulares do giro denteado (GD) (Bedi 1991).

1.2 Desnutrição, Crises Convulsivas e Epilepsia

A palavra epilepsia vem do grego *epilepsia*, 'doença que provoca repentina convulsão ou perda da consciência'. O mecanismo básico de todas as epilepsias resume-se a uma atividade elétrica anormal de um grupo de neurônios que provocam uma descarga funcional desorganizada (Paglioli et al 2004). A epilepsia é uma patologia de grande

prevalência em países em desenvolvimento. Ademais, trata-se de uma doença de indivíduos jovens, sendo especialmente prevalente na infância (Burneo et al 2005). Sabe-se que o status epilético (SE) acarreta danos cerebrais, visto tanto em estudos clínicos como experimentais. Diversos estudos em ambas as áreas elucidam o efeito das crises convulsivas no cérebro imaturo, mostrando a ocorrência de danos estruturais celulares e suas consequências bioquímicas e alterações permanentes cognitivas e comportamentais (Cornaggia et al 2006; Holmes 2004; Liu et al 1999).

Crise convulsiva é uma súbita descarga elétrica nos neurônios do córtex cerebral, capaz de alterar um comportamento ou função. Epilepsia é definida pela presença de crises epiléticas recorrentes não provocadas (Engel 2006). No período neonatal as convulsões são a manifestação neurológica mais frequentemente observada, ocorrendo entre 0,2 e 1,4% dos casos e podem estar associadas a múltiplos fatores etiológicos (Lombroso 1983; 1996a). Este período é também uma fase de maior suscetibilidade ao desenvolvimento de convulsões (Lombroso 1996b).

A epilepsia é a doença neurológica mais comum da infância. Em todo o mundo, cerca de 10,5 milhões de crianças são diagnosticadas com epilepsia, correspondendo a 25% da população mundial portadora da doença (Forsgren 2004). A cada ano, 3,5 milhões de novos casos de epilepsia são relatados. Quarenta por cento deste grupo possui menos que 18 anos de idade e mais de 80% deles vivem em países em desenvolvimento (Forsgren 2004). Embora as crises epiléticas possam ocorrer em qualquer idade, elas são mais frequentes na população jovem: até os 20 anos sendo que, 90% dos indivíduos que serão epiléticos já iniciaram suas crises ainda na infância. Entre as crianças, 60% tiveram a sua primeira crise até os três anos, sendo que a maior parte destas ocorre no primeiro ano de vida (Lombroso 1998).

No mundo, a incidência de epilepsia varia de 30 a 50 pessoas por 1000 habitantes/ano e sua prevalência é de cinco a nove pessoas por 1000 habitantes (Logroschino et al 2001). No Brasil essa prevalência sobe para 12 pessoas por 1000 habitantes (Guerreiro 2000) e em Porto Alegre sobe para 16,5 pessoas por 1000 habitantes (Fernandes 1993). A

relação entre desnutrição precoce e epilepsia foi amplamente estudada por Bronzino e Wasterlain (Bronzino et al 1986), sugerindo que a associação entre desnutrição e crises convulsivas reduz o DNA cerebral e predispõem ao desenvolvimento de epilepsia (Bronzino et al 1986; Carlton & Kelly 1969). Pesquisas clínicas e experimentais sugerem que a desnutrição é responsável por alterações cognitivas e comportamentais (Hemb et al 2010; Valadares et al 2010), além das crises convulsivas associadas também promoverem alterações na memória e no comportamento (Simao et al 2012).

A desnutrição não pode ser considerada como causa direta de epilepsia, mas vários estudos utilizando modelos animais sugerem que a associação entre epilepsia e desnutrição é responsável por alterações no SNC em desenvolvimento (Austin-Lafrance et al 1991; Cabral et al 2011; Nunes et al 2000). As crises convulsivas acontecem com maior frequência no período neonatal e durante a primeira infância, do que em qualquer outra etapa da vida (Holmes 2004). O nascimento de crianças prematuras com baixo peso e, por conseguinte, com o cérebro mais suscetível a gerar crises convulsivas é muito prevalente em nosso meio. O cérebro humano imaturo está mais predisposto a gerar crises convulsivas do que o cérebro maduro e existem evidências de que crises prolongadas em um cérebro em fase de desenvolvimento aumentam o risco de crises convulsivas subsequentes, assim como de epilepsia (Huang et al 2002)

Estudos experimentais demonstraram redução do peso cerebral em animais que sofreram crises convulsivas induzidas flurotil (Simao et al 2012; Wasterlain 1976), ou por outros modelos epileptogênicos (Nairismagi et al 2006; White 2002). No rato imaturo, alguns autores postulam menor vulnerabilidade cerebral ao dano secundário ao SE que nos cérebros de ratos maduros. Verificou-se menor influxo de cálcio para o meio intracelular e consequente menor dano à célula (Marks et al 1996), mais resistência a dano celular na transmissão sináptica quando expostos à anóxia (Cherubini et al 1989), menor propensão ao dano celular decorrente de crises convulsivas (Sankar et al 1998), e mais resistência aos efeitos tóxicos do glutamato (Liu et al 1996).

Ainda no cérebro imaturo, crises recorrentes nas primeiras semanas de vida aparentemente não resultam em perda celular, mas associam-se a um extenso brotamento de fibras musgosas em região CA3 do hipocampo (Riviello et al 2002), bem como a neurogênese no GD (McCabe et al 2001).

1.3 Hipocampo

O hipocampo, estrutura subdividida em 4 regiões Corno de Amón 1 (CA1), Corno de Amón 2 (CA2), Corno de Amón 3 (CA3) e Giro Dentado (GD), como mostra na figura 1, é a estrutura mais acometida pela carência nutricional com alterações morfológicas melhor documentadas na literatura (Fukuda et al 2002). Sendo o hipocampo uma estrutura sabidamente crucial nos processos de memória e comportamento, entendemos mais claramente o meio pelo qual esse processo leva a danos cognitivos. Os efeitos no hipocampo secundários à desnutrição incluem redução no tamanho das células do GD e diminuição das ramificações e espinhas dendríticas nos neurônios piramidais (Garcia-Ruiz et al 1993).

Lukonayov & Andrade (Lukoyanov & Andrade 2000), estudaram os efeitos da desnutrição tardia em ratos (iniciada aos dois meses de idade), com posterior RN. Os autores observaram redução no número total de células hipocâmpais no GD, CA1 e CA3. Ademais, relataram perda de 30% das sinapses entre as fibras musgosas e os dendritos das células piramidais de CA3. Esta alteração foi revertida após a RN. As regiões do córtex entorrinal e *subiculum* também são prejudicadas, conforme relataram Andrade e colaboradores em 1998 (Andrade et al 1998).

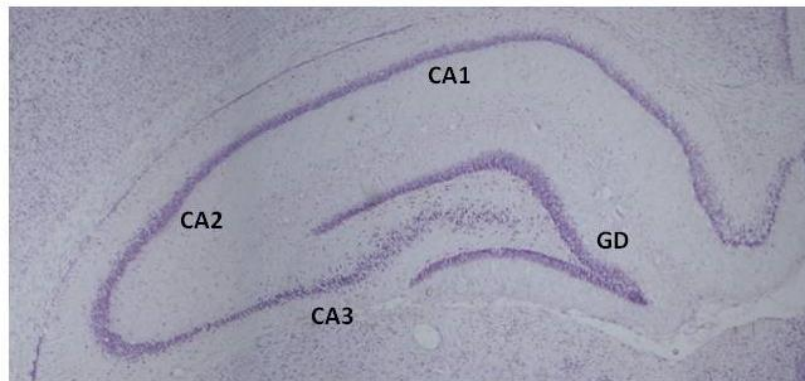


Figura 1. Hipocampo de um rato adulto e suas subregiões

1.4 Enriquecimento Ambiental

Hebb e colaboradores, em 1947, criaram o Ambiente Enriquecido (AE), moradia na qual os animais alocados têm a possibilidade de explorar objetos variados, como bolas, canos, abrigos, rampas, dos mais diversos tamanhos, cores e materiais. As caixas geralmente são maiores e com maior número de animais possibilitando maior interação entre os animais e maior estimulação física e sensorial (Ip et al 2002).

Em caixas moradia regulares, os animais são mantidos em número de 3 a 6, sem objetos no seu interior, exceto água e ração. Os diversos modelos de AE variam quanto ao número de animais alocados em cada caixa, geralmente de 5 a 12, proporcionando uma maior interação social. As caixas moradia utilizadas são maiores, e como citado anteriormente, contêm objetos variados no seu interior, para livre exploração dos animais (Amaral et al 2008).

Sabe-se que a estimulação no período neonatal pode afetar o comportamento e as respostas endócrinas, além de ter um efeito positivo sobre o processo de envelhecimento, protegendo o hipocampo da perda neuronal e das disfunções relacionadas à idade (Mohammed et al 1993). O Enriquecimento ambiental é definido como uma combinação de interação social, exercícios físicos e exposição continuada a “possibilidades de

aprendizagem” que, segundo Krech e colaboradores (Krech et al 1960) pode alterar a estrutura e função do encéfalo de roedores. Estudos em animais com lesão cerebral apontam que o AE estimula a neuroplasticidade neuronal, facilita o aprendizado e diminui o dano cognitivo pós lesão (Gundersen & Jensen 1987; van Praag et al 2000).

O protocolo de AE é variável. Geralmente há variações no tamanho das caixas, na composição, duração, complexidade social e de estímulos por objetos, e na frequência da troca de objetos. Alguns estudos utilizam a manutenção permanente dos animais no ambiente enriquecido, enquanto outros utilizam a estimulação prévia (Belayev et al 2003; Biernaskie & Corbett 2001). Ainda existem estudos que utilizam a manutenção permanente no ambiente, enquanto outros utilizam um protocolo de estimulação durante um determinado período do dia (Frick & Fernandez 2003; Gobbo & O'Mara 2004; Rampon et al 2000). Esta variedade de protocolos de estimulação acaba por dificultar a discussão e comparação dos efeitos do AE sobre os mais diversos aspectos avaliados (Bennett et al 2006).

Diversos estudos tem demonstrado que o córtex cerebral dos animais expostos ao AE apresenta maior espessura quando comparados com animais que vivem em condições padrão. Este efeito cortical pode ocorrer por inúmeros fatores, dentre eles, aumento do soma neuronal, do número e comprimento de dendritos bem como de espinhas dendríticas (Diamond et al 1964). Recentemente estes achados foram corroborados por estudos que demonstram que o AE pode influenciar a recuperação após um evento traumático, induzindo mudanças estruturais no Córtex, com aumento na densidade dos espinhos dendríticos e do número de neurônios no giro dentado (Johansson & Belichenko 2002; Puurunen et al 2001; Tuor et al 2001).

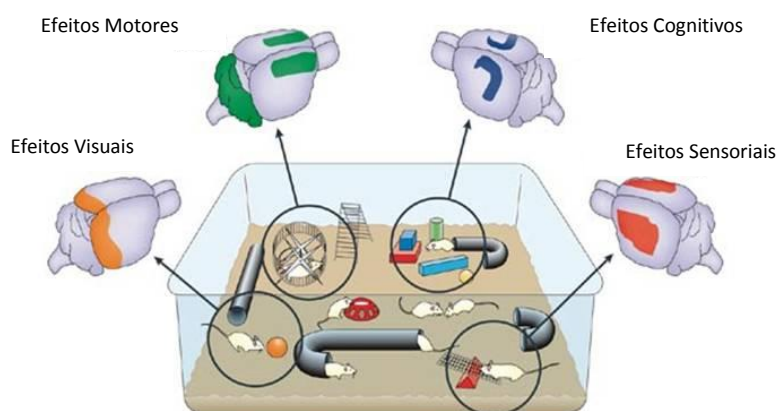


Figura 2. Esquema ilustrando os efeitos sensoriais, cognitivos, motores e sociais da exposição de ratos ao ambiente enriquecido (Nithianantharajah & Hannan 2006).

O AE também pode causar mudanças neuroquímicas. Em um estudo recente foi verificado que o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) teve seus níveis aumentados em ratos que viveram em um ambiente enriquecido quando comparados com animais que viveram em moradias padrão (Gobbo & O'Mara 2004). Os fatores neurotróficos controlam as vias de sinalização intra e intercelular que formam os circuitos neuronais durante o desenvolvimento e regulam a plasticidade bem como a sobrevivência neuronal, o crescimento axonal e neurotransmissão no encéfalo adulto (Mattson et al 2004).

Uma série de estudos relata melhora na recuperação motora e cognitiva dos animais que sofreram danos cerebrais isquêmicos e foram submetidos ao EA, além de demonstrarem diminuição da área cortical infartada, aumento nas células progenitoras de astrócitos e oligodendrócitos, bem como de células-tronco neurais (Johansson & Belichenko 2002; Komitova et al 2005; Risedal et al 2002). Nos modelos experimentais em epilepsia o ambiente enriquecido demonstrou aumentar a resistência a crises e diminuir déficits cognitivos associados, além de levar a inúmeras alterações a nível celular (Faverjon et al 2002; Koh et al 2005; Young et al 1999).

Uma grande variedade de parâmetros de plasticidade foi demonstrada, como aumento da neurogênese (Kempermann & Gage 1999; Kempermann et al 1997; van Praag et al 2000), da gliogênese e das arborizações dendríticas (Nakamura et al 1999). Kempermann et al (Kempermann et al 1997) demonstraram aumento da camada granular secundária ao ganho de 15% de neurônios granulares no GD de camundongos submetidos ao EA. Outros autores relataram aumento significativo da densidade sináptica e do número total de sinapses nos animais ambientalmente estimulados (Ip et al 2002; Rosenzweig 1996), além de importante aumento da plasticidade cortical relacionada à maior expressão de genes como o gene Arc, envolvido no processo molecular da plasticidade celular (Pinaud et al 2001). Quanto ao peso cerebral, foi relatado aumento do peso dos cérebros de animais submetidos a diferentes protocolos de EA (Iso et al 2007; Rosenzweig & Bennett 1972).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

2.1.1 Verificar o efeito do ambiente enriquecido na morfometria hipocampal em ratos adultos submetidos a crises convulsivas e desnutrição precoce,

2.2 Específicos

2.2.1 Avaliar os efeitos da desnutrição e crises convulsivas precoces no volume hipocampal de ratos adultos.

2.2.2 Avaliar os efeitos da desnutrição e crises convulsivas precoces na densidade neuronal e glial das regiões de CA1 e CA3 do hipocampo de ratos adultos.

2.2.3 Avaliar os efeitos da desnutrição e crises convulsivas precoces na espessura da área de CA1 do hipocampo de ratos adultos.

3 METODOLOGIA

Estudo experimental, controlado, desenvolvido no Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (IPB- PUCRS), aprovado pelo Comitê de Ética (Ofício 08011- CEUA).

Foram utilizadas ao todo no experimento ratas fêmeas Wistar prenhas e suas ninhadas (restritas a 10 animais), totalizando 40 ratos. Os animais foram mantidos durante o período experimental no Instituto de Pesquisa Biomédica da PUCRS, alojados em sistema de gaiola individualizada e climatizada (*one cage system*). Os animais foram mantidos em sistema de 12 horas claro/escuro com água e ração livres.

3.1 Esquema dos experimentos

3.1.1 Descrição dos grupos

Composta de 40 animais, divididos em 8 grupos (NC, N+AE, N+CC, N+CC+AE, DC, D+AE, D+CC e D+CC+AE) dispostos da seguinte maneira: (1) Todos os animais do subgrupo nutrido foram mantidos com a fêmea nutriz durante todo o experimento em caixas-moradia regulares; (2) Todos os animais do subgrupo desnutrido foram afastados gradualmente da fêmea nutriz entre o dia pós-natal 2 (P2) e P15. (3) Todos os animais foram separados definitivamente da fêmea nutriz em P21, idade em que finaliza a lactação. Abaixo a descrição dos grupos:

N: grupo nutrido controle. Em P21, os animais (n=6) foram separados da fêmea nutriz e alocados em caixas regulares com alimentação livre. Em P51 os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca.

N+AE: grupo nutrido submetido ao ambiente enriquecido. Em P21 os animais (n=6) foram separados da fêmea nutriz e alocados em caixas moradia especiais (AE).. Em P51 os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca.

N+CC: grupo nutrido submetido ao modelo de crises convulsivas precoces induzidas por Flurotil. Em P21 os animais (n=6) foram separados da fêmea nutriz e alocados em caixas regulares. Em P51 os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca.

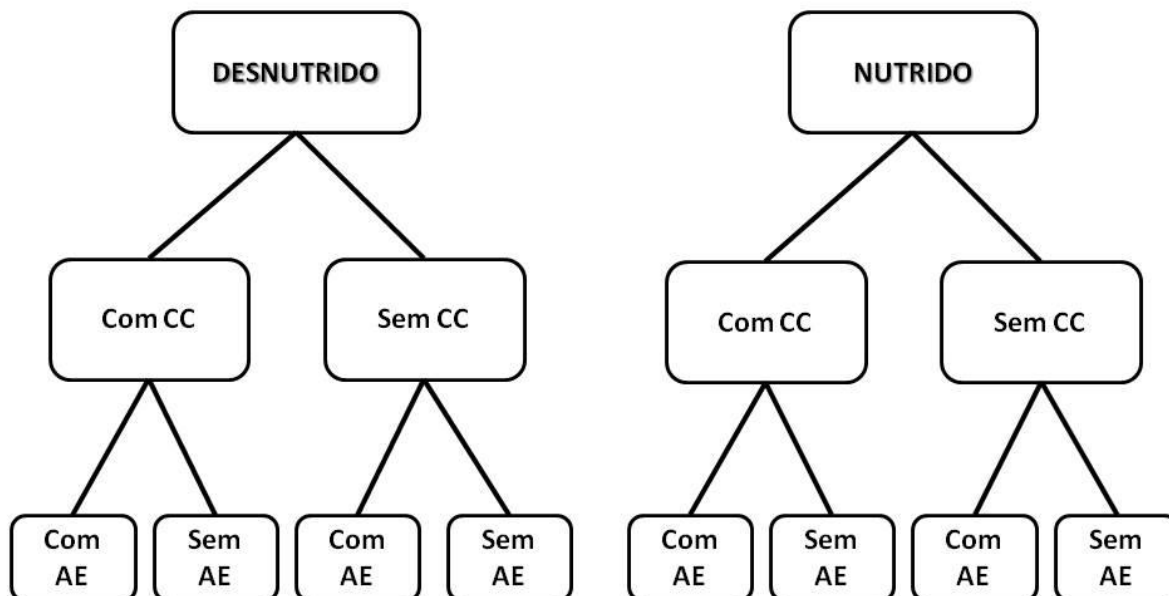
N+CC+AE: grupo nutrido submetido ao modelo de crises convulsivas precoces induzidas por Flurotil. Entre P21 e P51 os animais (n=6) foram alocados em caixas moradia especiais (AE). Em P51 os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca.

DC: grupo controle desnutrido. Em P21, , os animais (n=6) foram separados da fêmea nutriz e alocados em caixas regulares. Em P51 os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca.

D+AE: grupo desnutrido submetido ao ambiente enriquecido. Em P21 os animais (n=6) foram separados da fêmea nutriz e alocados em caixas moradia especiais (AE). Em P51 os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca.

D+CC: grupo desnutrido submetido ao modelo de crises convulsivas precoces induzidas por Flurotil. Em P21os animais (n=6) foram separados da fêmea nutriz e alocados em caixas regulares. Em P51 os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca.

D+CC+AE: grupo desnutrido submetido ao modelo de crises convulsiva precoces induzidas por Flurotil. Entre P21 e P51 os animais (n=6) foram alocados em caixas moradia especiais (AE). Em P51 os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca.



3.2 Paradigma da Desnutrição

O modelo de desnutrição utilizado neste estudo foi o modelo de limitação progressiva ao acesso de leite por separação da fêmea nutriz e filhotes. O afastamento iniciou em P2, com duas horas de duração, e foi aumentando progressivamente em 2 horas por dia até o máximo de 12 horas/dia. A desnutrição foi mantida até P15. Após P15 os filhotes foram novamente alocados com a fêmea nutriz, encerrando o período de desnutrição. Durante o período de separação, os filhotes foram mantidos juntos em gaiola aquecida, de modo que a temperatura corporal se mantivesse em torno de 34º C, tentando assim reduzir o estresse dos animais.

Os animais nutridos permaneceram com a fêmea nutriz com livre acesso à lactação. Todos os filhotes foram separados da fêmea nutriz em P21, quando termina o período de lactação.

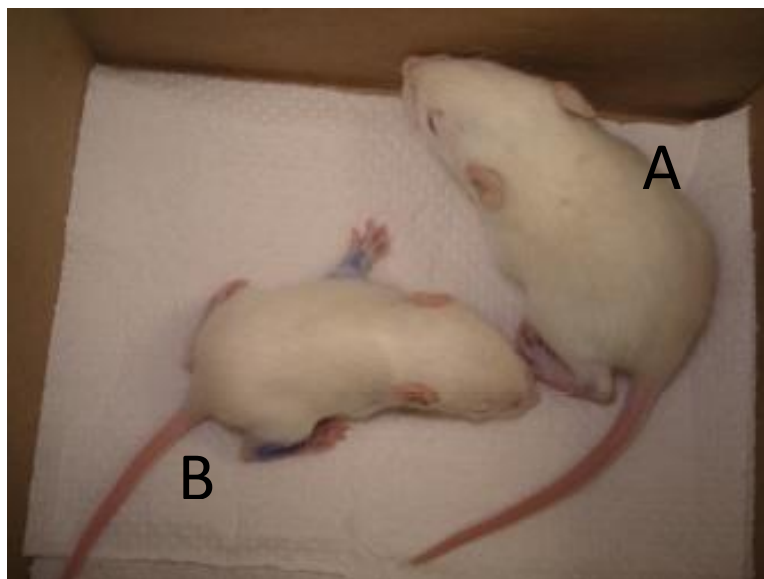


Figura 3: Comparação dos tamanhos de um rato Nutrido (A) e um desnutrido (B) da mesma idade (P15).

3.3 Modelos de Crises

O flurotil [bis-(2,2,2-trifluorethyl) éter] é um agente volátil que estimula rapidamente o sistema nervoso central, induzindo crises convulsivas generalizadas. O flurotil foi utilizado em câmara vedada, posicionada dentro da capela do laboratório. Foi utilizada uma bomba de infusão para controle do gotejamento (Veliskova et al 1996)

O modelo de crises convulsivas consiste no gotejamento de 6 gts/min de flurotil. O horário da primeira crise convulsiva do animal foi registrado e o gotejamento cessado. Foram induzidas 3 crises por dia, com intervalo de 1 hora entre as mesmas. Tal processo foi repetido durante três dias consecutivos, P8, P9 e P10. Esta faixa corresponde ao período neonatal de seres humanos até os 9 meses de idade.



Figura 4: Modelo de câmara vedada para experimentos com. A bomba de infusão acoplada permite gotejo constante da droga. Na parte anterior visualiza-se dispositivo que permite a entrada de ar. A evacuação do agente é realizada através de vácuo-sucção.

3.4 Modelo de enriquecimento ambiental

Entre P21 e P51 os animais foram alocados em caixas moradia especiais. As caixas utilizadas nessa fase possuem dimensões de 70 cm largura x 50 cm profundidade x 50 cm de altura, e dois andares comunicados por uma rampa. Em seu interior foram distribuídos objetos variados como bolas, canos, cubos e caixas, de diferentes cores, tamanhos e materiais. Os objetos foram trocados uma vez por semana, tomando-se o cuidado de não repetir os mesmos objetos em semanas consecutivas (Simao et al 2012). As caixas foram mantidas em ambiente climatizado, os animais tiveram livre acesso à água e ração e permaneceram em regime claro-escuro 12/12h.



Figura 5. Exemplo de Enriquecimento Ambiental no biotério do IPB- PUCRS.

3.5 Protocolo de inclusão de encéfalos para avaliação da Morfometria e Histologia do Hipocampo

Para realização da histologia e morfometria, os animais foram anestesiados com xilasina 2% e quetamina 5% e submetidos a perfusão transcardíaca. Após a excisão cirúrgica dos cérebros, os mesmos foram colocados no paraformaldeído 4% por um período de 24 a 48 horas. Em seguida, foram transferidos para uma solução de sacarose 30% para crioproteção do tecido (3-4 dias). Após este período os encéfalos foram congelados em nitrogênio líquido. Os cérebros foram seccionados em criostato com uma espessura de 20 μm . Os cortes foram distribuídos com o intervalo de uma seção coletada para 10 eliminados, conforme o método de Cavalieri (Yan et al 2003). Os cortes foram distribuídos de maneira subsequente e contínua. As lâminas foram coradas pelos métodos de violeta de cresila, também conhecido como método de Nissl. O hipocampo, assim como suas subdivisões, foram identificados de acordo com o atlas rat brain (Paxinos 1998).

A avaliação morfométrica do cérebro foi realizado com o método de contagem de pontos. As lâminas com os cortes coronais foram sobrepostos em papel gráfico milimétrico (grade de pontos) e obtidas imagens utilizando uma lupa *Stereomicroscopio Zeiss*, modelo Stemi SV 6. Foram selecionadas todas as camadas das áreas correspondentes do hipocampo (CA1, CA2, CA3 e GD). Todos os pontos que atingiram cada seção do cérebro

foram contadas e usadas para calcular o volume. O volume foi calculado utilizando a seguinte equação: $V=Ta/p.\Sigma P$, em que V =volume de estimacão; T =distncia entre os pontos analisados; a/p =rea do ponto (1 mm^2) e ΣP é a soma dos pontos sobrepostos na imagem.



Figura 6. Metodologia utilizada para a contagem, através da grade de pontos, para volumetria do Hipocampo

Para a análise histológica do hipocampo foram selecionadas regiões de CA1 e CA3. Tais regiões por escolhidas serem amplamente estudadas e relacionadas a danos cerebrais decorrentes da desnutrio e crises convulsivas precoces (Diaz-Cintra et al 1994; Garcia-Ruiz et al 1993; Lukoyanov & Andrade 2000). O estudo histológico foi realizado com microscópio Olympus, modelo BX 51 de campo claro com uma câmera CCD (Qimaging, modelo Micro Publisher 3.3 RTV) acoplada. O microscópio é equipado com lentes de magnitude de 5X, 10X, 40X, 100X. As imagens selecionadas foram digitalizadas em abertura fixa com magnitude de 40X.

A contagem celular neuronal foi realizada através do sistema quantitativo bidimensional, por teste de pontos criado pelo software Image Pro Plus 6.0 (Capture Media Cybernetics, USA). A QA (número dos neurônios contados na área teste) foi o número de

corpos neuronais vistos em somente um foco, quando eles estão totalmente ou parcialmente dentro da região de estudo. As células gliais foram identificadas e diferenciadas dos neurônios por seu tamanho relativamente menor e ausência de coloração citoplasmática em contraste com os neurônios (Schmitz & Hof 2005).

A contagem foi feita nos hipocampos direito e esquerdo em um dissector com volume de 0,00003776 mm³. Para obter-se uma contagem imparcial da estrutura utilizou-se uma grade com duas linhas proibidas (exclusão) e duas linhas aceitáveis (inclusão); quando o “objeto” tocasse as linhas proibidas ele não poderia ser contado, no entanto, quando tocasse as linhas aceitáveis ou estivesse completamente dentro da área foi contabilizado. (Gundersen et al 1988a; Gundersen et al 1988b).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Estudo experimental, controlado, desenvolvido no Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (IPB- PUCRS), aprovado pelo Comitê de Ética (Ofício 08011- CEUA).

Os dados contínuos deste estudo foram descritos por média e desvio-padrão. Dados categóricos foram expressos por contagens e percentuais. Para analisar os efeitos, utilizamos um modelo de análise de covariância incluindo os fatores nutrição, crise convulsiva e ambiente enriquecido. Além disso, foram adicionados dois efeitos de interação para nutrição vs crise convulsiva e nutrição vs ambiente enriquecido. Através da equação linear resultante foram obtidas as médias estimadas para os diferentes níveis e categorias formadas pelos grupos. O nível de significância adotado foi de $\alpha=5\%$. Os dados foram analisados com o auxílio do programa SPSS versão 18.0.

5 RESULTADOS

5.1 Volume do Hipocampo

A figura 7 e a tabela 1 mostram os valores para a volumetria do hipocampo considerando os fatores desnutrição, crise convulsiva e ambiente enriquecido. Observa-se que a desnutrição não influencia no volume médio do hipocampo dos diferentes grupos não apresentando diferenças estatísticas significativas ($P=0,349$). As crises convulsivas *per se* também não parecem influenciar a volumetria hipocampal ($P= 0,596$). Pode-se, entretanto, observar um efeito de aumento no volume do hipocampo dos animais que foram expostos ao Ambiente Enriquecido ($P<0,001$). Este aumento foi mais significativo nos animais nutridos que sofreram crises convulsivas.

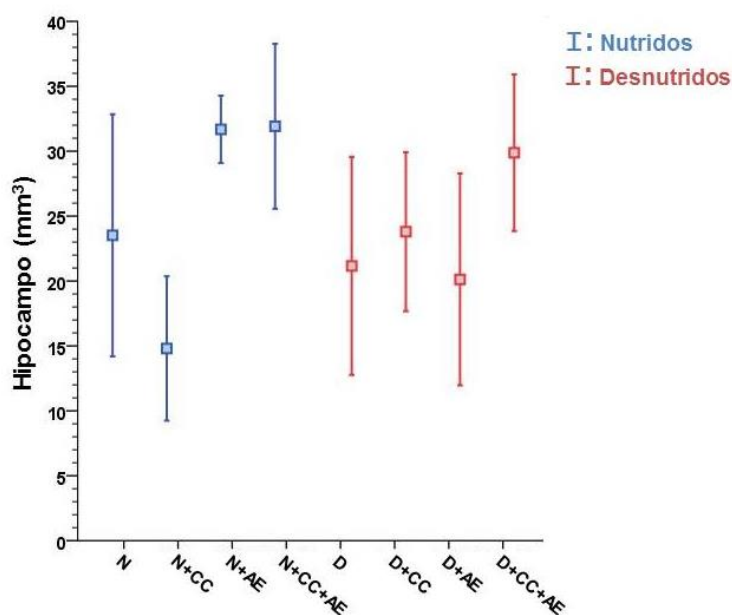


Figura 7 – Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de volumetria do hipocampo segundo os grupos estudados (n= 6 para todos os grupos).

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido.

Tabela 1 – Análise de covariância para a volumetria do hipocampo avaliando o efeito da nutrição (NUT), crises convulsivas (CC), ambiente enriquecido (AE) com fatores de interação para nutrição x crises convulsivas e nutrição x ambiente enriquecido em ratos wistar (n=40).

Fator	F	P
Nutrição	0,903	0,349
ambiente enriquecido	17,143	<0,001
crises convulsivas	0,287	0,596
NUT x CC	8,130	0,007
NUT x AE	7,639	0,009

A tabela 2 e figura 8 mostram as médias e as significâncias estatísticas comparando todos os grupos. Observa-se que a média do volume do hipocampo dos ratos nutridos foi de forma geral superior ao do grupo desnutrido (N=25,48 vs D= 23,74). Os animais que sofreram crises convulsivas apresentaram um volume médio superior aos animais que não sofreram crises (CC= 25,10 vs s/CC= 24,12). Já os animais que foram expostos ao AE apresentaram um volume de hipocampo estatisticamente significativo maior do que os animais que não foram expostos a esta estimulação (AE=28,40 vs s/AE= 20,82; P<0.001).

Tabela 2 – Significância Estatística para as comparações múltiplas^[1] entre as médias dos valores de volumetria do hipocampo entre os grupos estudados.

Grupo/Médias	Grupo/Médias						
	N+CC	N+AE	N+CC+AE	D	D+CC	D+AE	D+CC+AE
N	23.52	31.68	31.92	21.16	23.80	20.12	29.88
N+CC	14.80	0.001*	0.001*	0.611	0.201	0.789	0.003*
N+AE	31.68		1.000	0.083	0.347	0.420	0.999
N+CC+AE	31.92			0.072	0.312	0.036	0.999
D	21.16				0.994	1.000	0.233
D+CC	23.80					0.962	0.662
D+AE	20.12						0.132

[1]: ANOVA oneway (F=x,xx; P=0,000) seguida de teste de *post-hoc* de Tukey. *: representa diferenças estatisticamente significativas para $\alpha=0,05$.

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido.

Volume do Hipocampo

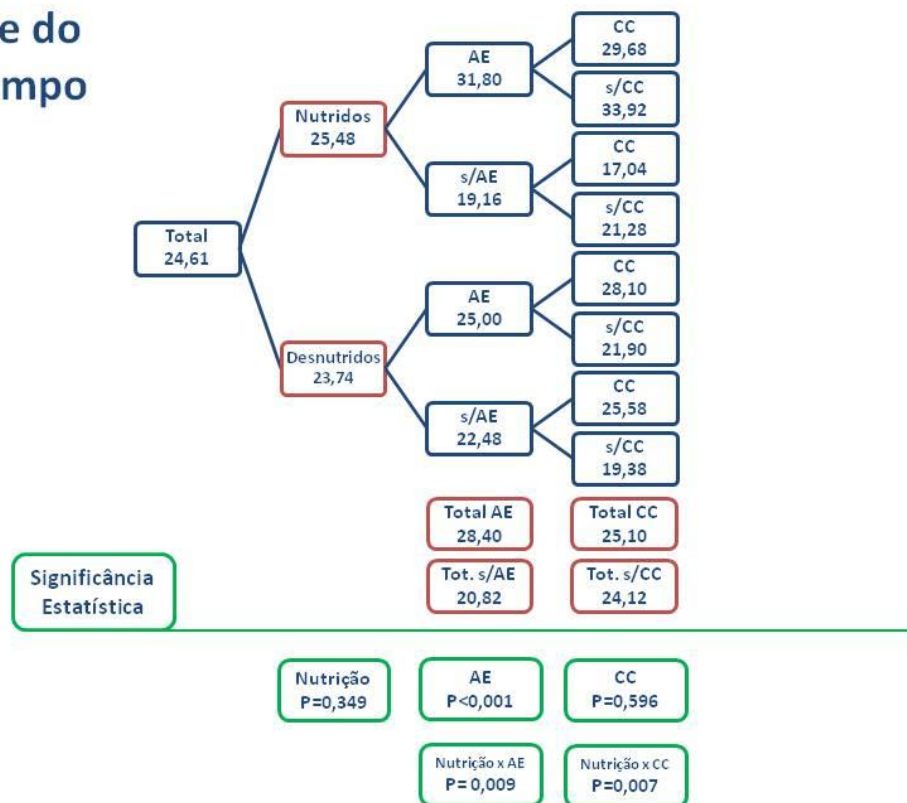


Figura 8. Fluxograma de valores médios para volume do Hipocampo para os grupos estudados (n= 6 para todos os grupos).

5.2 Densidade Neuronal na região de CA1

A figura 9 e a tabela 3 mostram os valores para a densidade neuronal na região de CA1 considerando os fatores desnutrição, crise convulsiva e ambiente enriquecido. Observa-se que a desnutrição promove uma diminuição na densidade neuronal na região de CA1 quando comparada ao grupo de animais nutridos ($P= 0,002$). As crises convulsivas *per se* também não parecem influenciar na densidade neuronal na região de CA1 ($P= 0,103$), assim como o AE enriquecido também parece não influenciar sobre a densidade de neurônios na região de CA1 ($P= 0,606$).

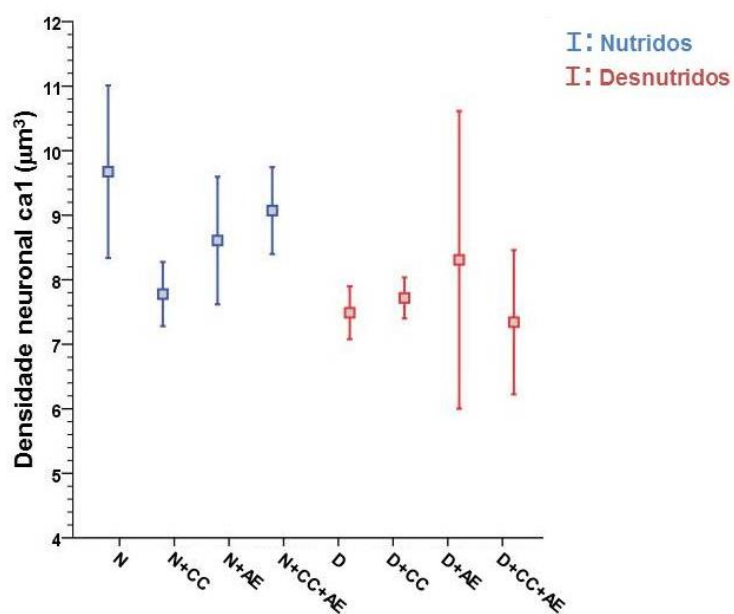


Figura 9 – Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de densidade neuronal na região de CA1 do hipocampo segundo os grupos estudados (n= 6 para todos os grupos).

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido

Tabela 3 – Análise de covariância para a densidade neuronal na região de CA1 do hipocampo avaliando o efeito da nutrição (NUT), crises convulsivas (CC), ambiente enriquecido (AE) com fatores de interação para nutrição x crises convulsivas e nutrição x ambiente enriquecido em ratos wistar (n=40).

Fator	F	P
Nutrição	10,945	0,002
ambiente enriquecido	0,270	0,606
crises convulsivas	2,813	0,103
NUT x CC	0,290	0,594
NUT x AE	0,028	0,868

A tabela 4 e figura 10 mostram as médias e as significâncias estatísticas comparando todos os grupos. Observa-se que a média de densidade neuronal em CA1 dos ratos nutridos foi superior ao grupo desnutrido (N=8,78 vs D=7,71). Os animais que sofreram crises convulsivas apresentaram uma densidade neuronal na região de CA1 inferior aos animais que não sofreram crises (CC= 7,98 vs s/CC= 8,52). Os animais que foram expostos ao AE apresentaram uma densidade neuronal em CA1 superior quando comparados aos animais que não foram expostos a esta estimulação (AE=8,33 vs s/AE=8,17) sendo que esta diferença não foi estatisticamente significativa (P= 0,606). A figura 11 ilustra a partir das amostras coletadas, um comparativo na densidade neuronal na região de CA1 de ratos nutridos controle e desnutridos controle com magnitude de 40X pela videocâmera.

Tabela 4 – Significância Estatística para as comparações múltiplas^[1] entre as médias dos valores densidade neuronal na região de CA1 do hipocampo entre os grupos estudados

Grupo/Médias	Grupo/Médias							
	N+CC 7.78	N+AE 8.61	N+CC+AE 9.07	D 7.49	D+CC 7.72	D+AE 8.31	D+CC+AE 7.34	
N	9.67	0.046	0.597	0.964	0.013	0.036	0.293	0.007*
N+CC	7.78		0.834	0.357	1.000	1.000	0.982	0.994
N+AE	8.61			0.992	0.537	0.781	0.999	0.384
N+CC+AE	9.07				0.148	0.304	0.884	0.087
D	7.49					1.000	0.842	1.000
D+CC	7.72						0.968	0.998
D+AE	8.31							0.705

[1]: ANOVA oneway (F=x,xx; P=0,000) seguida de teste de *post-hoc* de Tukey. *: representa diferenças estatisticamente significativas para $\alpha=0,05$.

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido.

Densidade Neuronal ca1

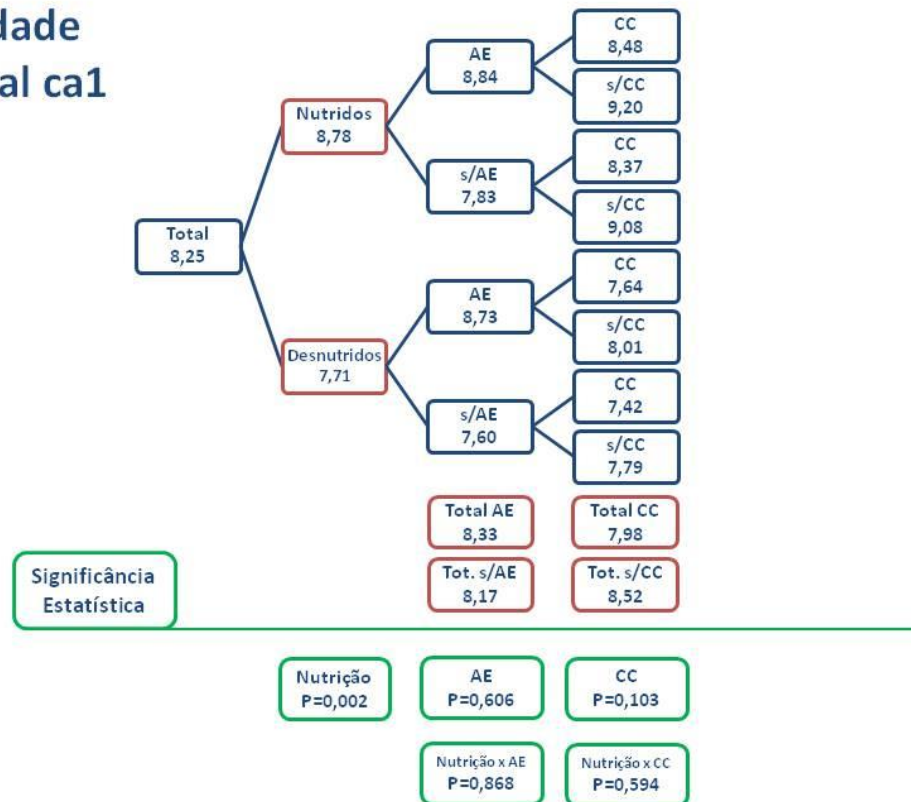
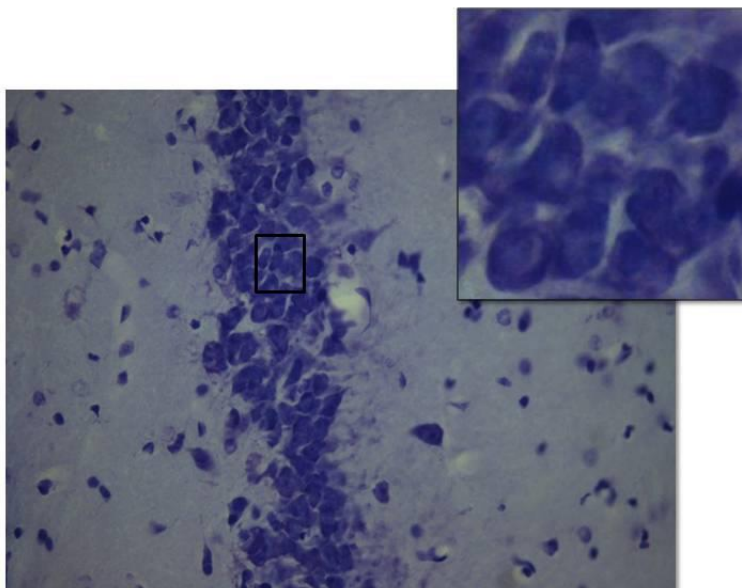
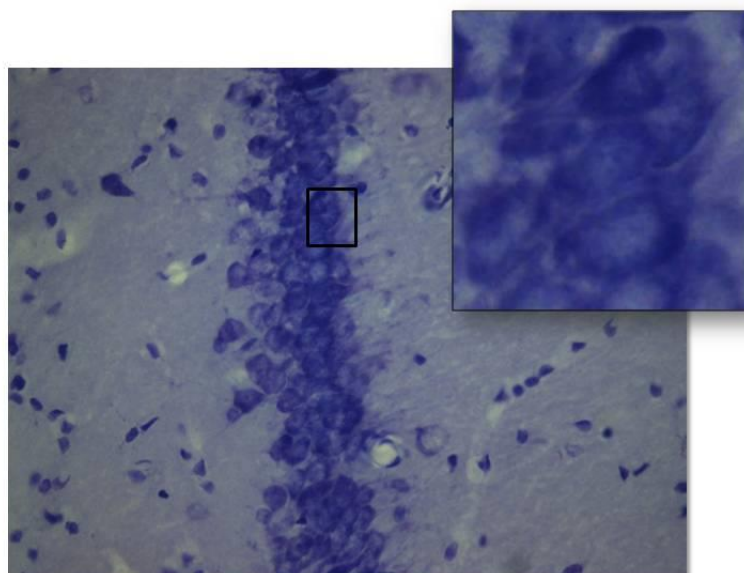


Figura 10. Fluxograma de valores médios para densidade neuronal na região de CA1 para os grupos estudados (n= 6 para todos os grupos).

Figura 11

(A) Amostra de uma área com magnificação 40X com coloração Nissl da densidade neuronal na região de CA1 de um rato nutrido controle. (B) Dissector utilizado para contagem com magnitude de 50%



(A) Amostra de uma área com magnificação 40X com coloração Nissl da densidade neuronal na região de CA1 de um rato desnutrido controle. (B) Dissector utilizado para contagem com magnitude de 50%

5.3 Densidade neuronal na região de CA3

A figura 12 e a tabela 5 mostram os valores para a densidade neuronal na região de CA3 considerando os fatores desnutrição, crise convulsiva e ambiente enriquecido. Observa-se que a desnutrição promove uma diminuição na densidade neuronal na região de CA3 quando comparada ao grupo de animais nutridos ($P < 0,001$). As crises convulsivas também parecem influenciar na densidade neuronal de CA3, promovendo uma diminuição no número de neurônios desta região ($P = 0,015$). O AE por sua vez, parece não influenciar sobre a densidade de neurônios na região de CA3 ($P = 0,814$)

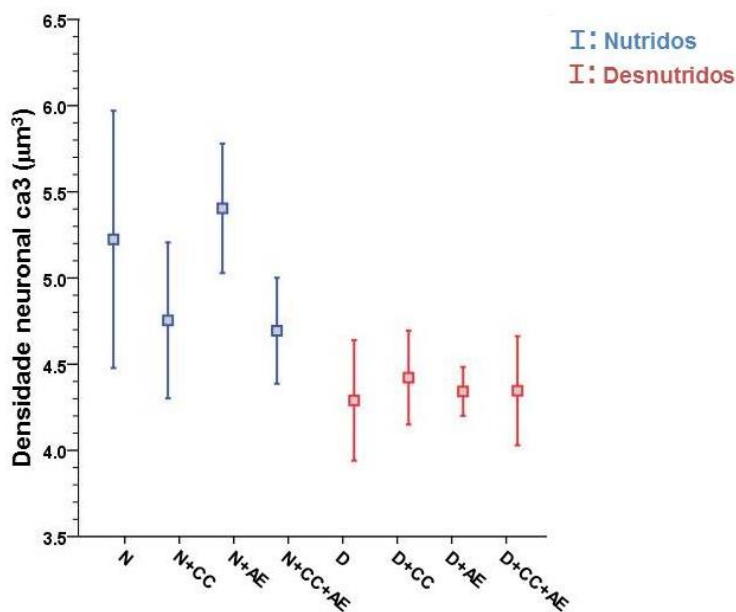


Figura 12 – Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de densidade neuronal na região de CA3 do hipocampo segundo os grupos estudados ($n=6$ para todos os grupos).

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido.

Tabela 5 – Análise de covariância para a densidade neuronal na região de CA3 do hipocampo avaliando o efeito da nutrição (NUT), crises convulsivas (CC), ambiente enriquecido (AE) com fatores de interação para nutrição x crises convulsivas e nutrição x ambiente enriquecido em ratos wistar (n=40).

Fator	F	P
Nutrição	43,477	<0,001
ambiente enriquecido	0,056	0,814
crises convulsivas	6,617	0,015
NUT x CC	10,515	0,003
NUT x AE	0,126	0,725

A tabela 6 e figura 13 mostram as médias e as significâncias estatísticas comparando todos os grupos. Observa-se que a média de densidade neuronal em CA3 do grupo nutrido foi superior ao grupo desnutrido (N=5,02 vs D= 4,35). Os animais que sofreram crises convulsivas apresentaram uma densidade neuronal na região de CA3 inferior aos animais que não sofreram crises (CC= 4,55 vs s/CC= 4,82). Os animais que foram expostos ao AE apresentaram uma densidade neuronal em CA3 superior quando comparados aos animais que não foram expostos a esta estimulação (AE=4,70 vs s/AE=4,67) sendo que esta diferença não foi estatisticamente significativa (P= 0,814). A figura 14 ilustra a partir das amostras coletadas, um comparativo na densidade neuronal na região de CA3 de ratos nutridos controle e desnutridos controle com magnitude de 40X pela videocâmera.

Tabela 6 – Significância Estatística para as comparações múltiplas^[1] entre as médias dos valores densidade neuronal na região de CA3 do hipocampo entre os grupos estudados

Grupo/Médias	Grupo/Médias						
	N+CC	N+AE	N+CC+AE	D	D+CC	D+AE	D+CC+AE
	4.75	5.40	4.69	4.29	4.42	4.34	4.35
N	5.22	0.336	0.987	0.205	0.002*	0.010	0.004*
N+CC	4.75		0.061	1.000	0.352	0.742	0.500
N+AE	5.40			0.031	<0.001*	<0.001*	<0.001*
N+CC+AE	4.69				0.524	0.885	0.684
D	4.29					0.998	1.000
D+CC	4.42						1.000
D+AE	4.34						1.000

[1]: ANOVA oneway (F=x,xx; P=0,000) seguida de teste de *post-hoc* de Tukey. *: representa diferenças estatisticamente significativas para $\alpha=0,05$.

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido.

Densidade Neuronal ca3

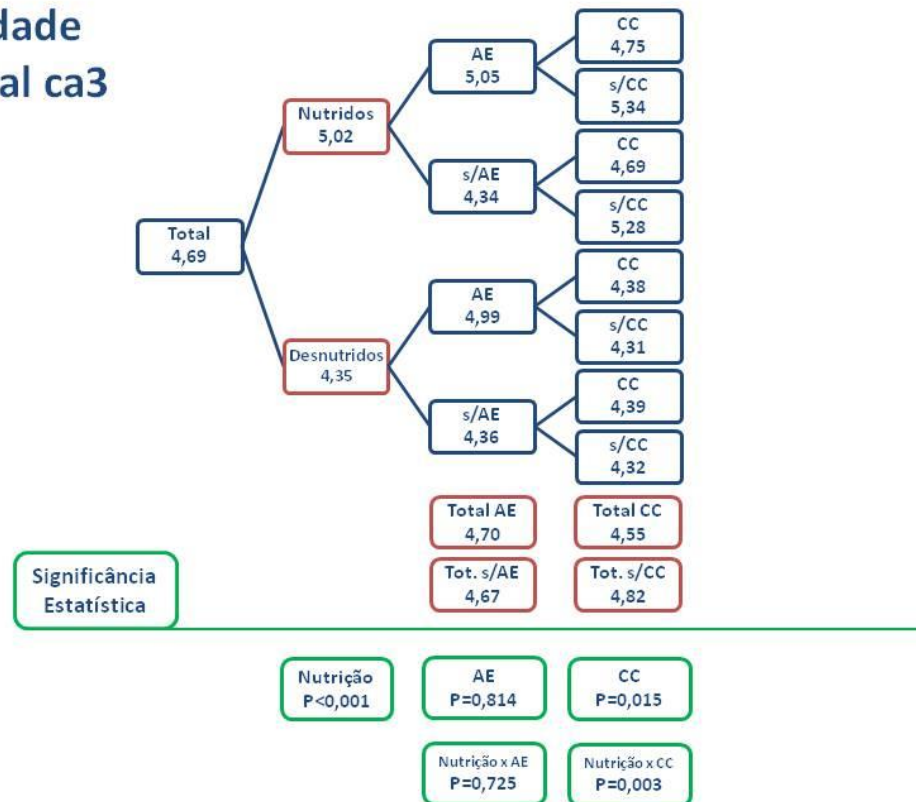
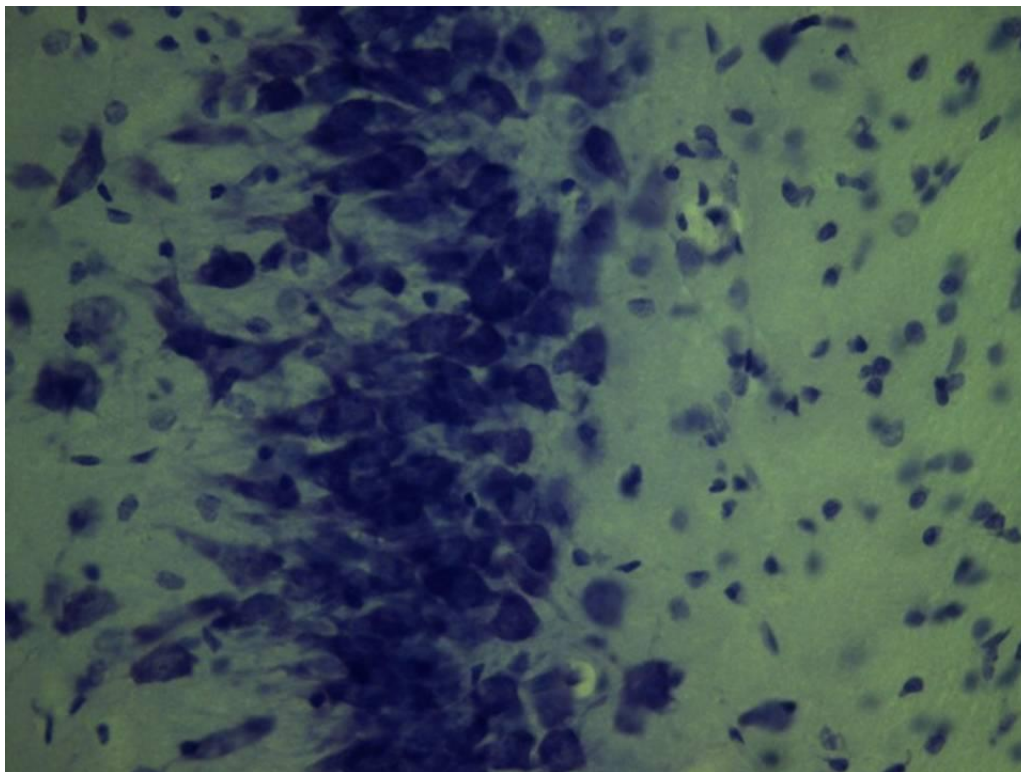
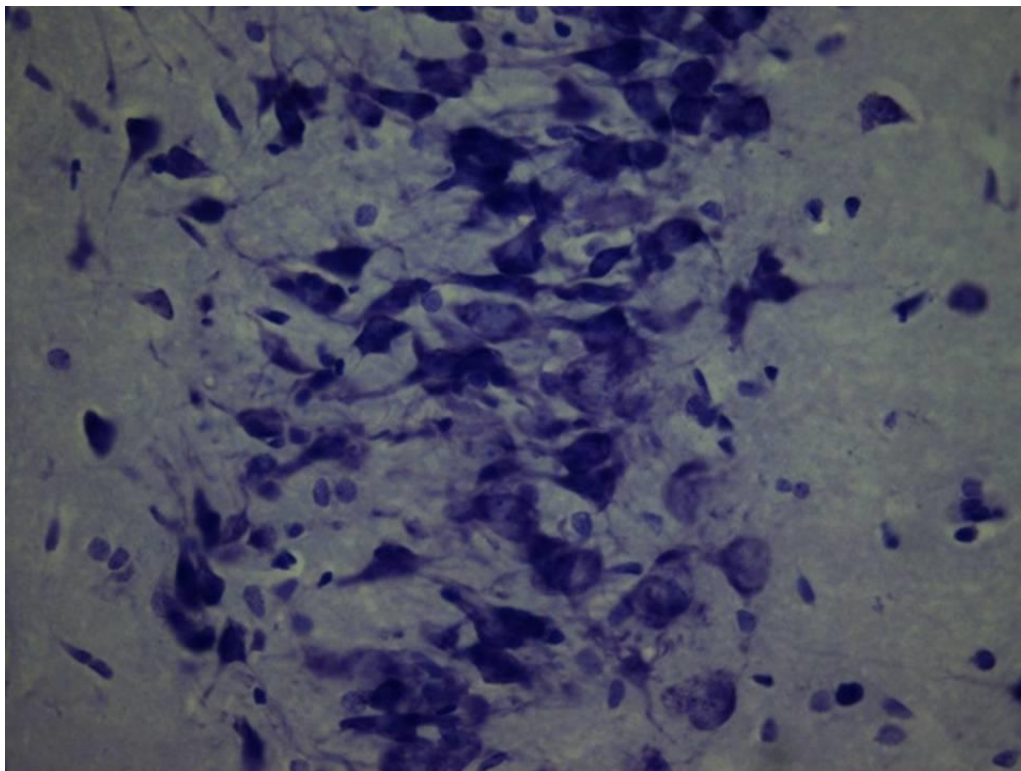


Figura 13. Fluxograma de valores médios para densidade neuronal na região de CA3 para os grupos estudados (n= 6 para todos os grupos).

Figura 14

Amostra com magnitude de 40X pela videocâmara da densidade neuronal da região de CA3 de um rato nutrido



Amostra com magnitude de 40X pela videocâmara da densidade neuronal da região de CA3 de um rato desnutrido

5.4 Densidade Glial na região de CA1

A figura 15 e a tabela 7 mostram os valores para a densidade glial na região de CA1 considerando os fatores desnutrição, crise convulsiva e ambiente enriquecido. Observa-se que a desnutrição promove uma diminuição na densidade glial na região de CA1 quando comparada ao grupo de animais nutridos ($P= 0,049$). As crises convulsivas também parecem diminuir a densidade de glias em CA1 ($P= 0,015$). O AE por sua vez, parece não influenciar sobre a densidade de glias na região de CA3 ($P= 0,081$). Não foram observados efeitos de interação entre CC vs NUT e AE vs NUT em relação a densidade glial de CA1.

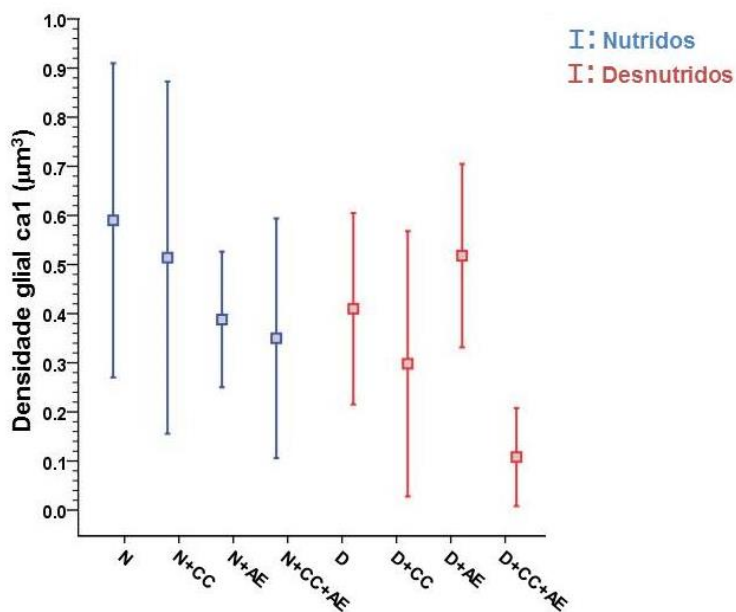


Figura 15 – Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de densidade glial na região de CA1 do hipocampo segundo os grupos estudados ($n= 6$ para todos os grupos).

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido.

Tabela 7 – Análise de covariância para a densidade glial na região de CA1 do hipocampo avaliando o efeito da nutrição (NUT), crises convulsivas (CC), ambiente enriquecido (AE) com fatores de interação para nutrição x crises convulsivas e nutrição x ambiente enriquecido em ratos wistar (n=40).

Fator	F	P
Nutrição	4,153	0,049
ambiente enriquecido	3,230	0,081
crises convulsivas	6,510	0,015
NUT x CC	2,679	0,111
NUT x AE	1,298	0,263

A tabela 8 e figura 16 mostram as médias e as significâncias estatísticas comparando todos os grupos. Observa-se que a média de densidade glial em CA1 do grupo nutrido foi superior ao grupo desnutrido (N= 0,46 vs D= 0,33; P= 0,049). Os animais que sofreram crises convulsivas apresentaram densidade glial na região de CA1 inferior aos animais que não sofreram crises (CC= 0,32 vs s/CC= 0,48) com significância estatística (P=0,015). Os animais que foram expostos ao AE apresentaram uma densidade glial inferior em CA1 quando comparados aos animais que não foram expostos a esta estimulação (AE=0,34 vs s/AE=0,45), mas esta diferença não apresenta significância estatística.

Tabela 8 – Significância Estatística para as comparações múltiplas^[1] entre as médias dos valores densidade glial na região de CA1 do hipocampo entre os grupos estudados

Grupo/Médias	Grupo/Médias						
	N+CC	N+AE	N+CC+AE	D	D+CC	D+AE	D+CC+AE
N	0.51	0.39	0.35	0.41	0.30	0.52	0.11
N+CC	0.59	0.998	0.721	0.527	0.820	0.286	0.999
N+AE	0.51	0.39	0.967	0.879	0.989	0.651	1.000
N+CC+AE	0.39	0.39	1.000	1.000	0.995	0.961	0.335
D	0.35	0.35	0.35	1.000	1.000	0.865	0.517
D+CC	0.41	0.41	0.41	0.41	0.983	0.986	0.249
D+AE	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.631	0.777
D+CC+AE	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.040

[1]: ANOVA oneway (F=x,xx; P=0,000) seguida de teste de *post-hoc* de Tukey. *: representa diferenças estatisticamente significativas para $\alpha=0,05$.

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido.

Densidade glial ca1

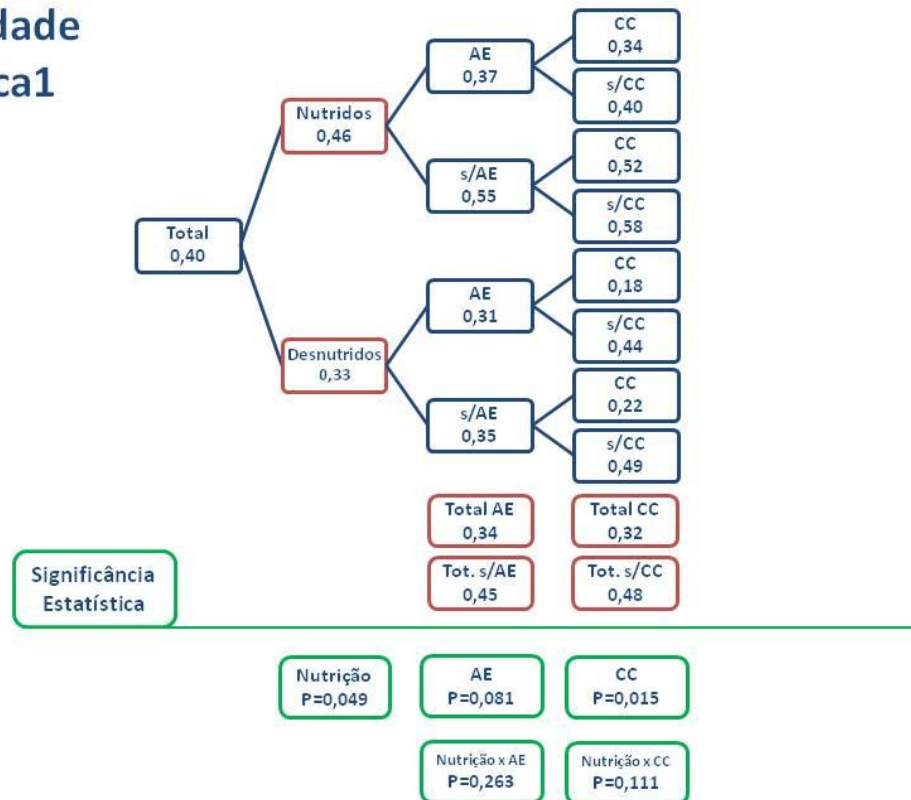


Figura 16 Fluxograma de valores médios para densidade glial na região de CA1 para os grupos estudados (n= 6 para todos os grupos).

5.5 Densidade Glial na região de CA3

A figura 17 e a tabela 9 mostram os valores para a densidade glial na região de CA3 considerando os fatores desnutrição, crise convulsiva e ambiente enriquecido. Não observam-se alterações decorrentes do fator desnutrição na densidade de glias na região de CA3 (P= 0,216). As crises convulsivas parecem influenciar na densidade de glias em CA1, (P=0,003). O AE parece influenciar a densidade de glias na região de CA1, promovendo uma redução do número de glias nesta região (P= 0,005). Não foram observados efeitos de interação entre CC vs NUT e AE vs NUT em relação a densidade glial de CA3.

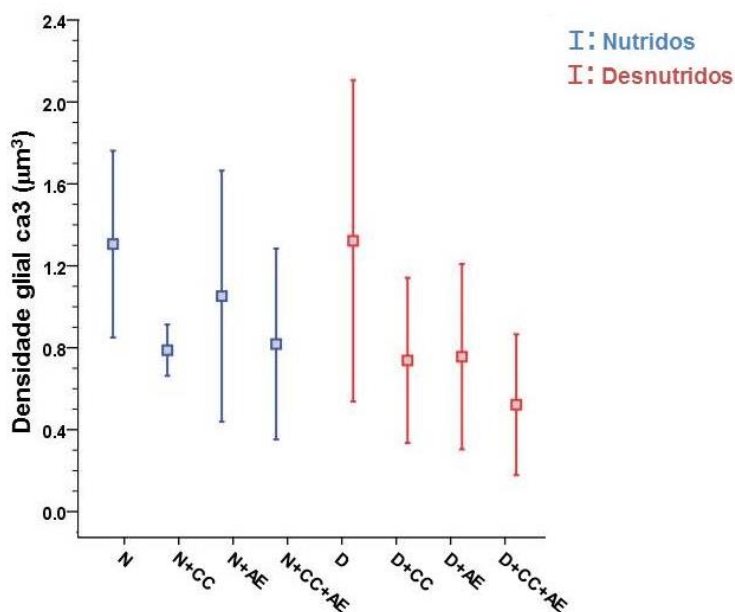


Figura 17 – Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de densidade glial na região de CA3 do hipocampo segundo os grupos estudados (n= 6 para todos os grupos).

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido.

Tabela 9 – Análise de covariância para a densidade glial na região de CA3 do hipocampo avaliando o efeito da nutrição (NUT), crises convulsivas (CC), ambiente enriquecido (AE) com fatores de interação para nutrição x crises convulsivas e nutrição x ambiente enriquecido em ratos wistar (n=40).

Fator	F	P
Nutrição	1,593	0,216
ambiente enriquecido	4,113	0,050
crises convulsivas	10,017	0,003
NUT x CC	0,018	0,895
NUT x AE	1,265	0,269

A tabela 10 e figura 18 mostram as médias e as significâncias estatísticas comparando todos os grupos. Observa-se que a média de densidade glial em CA3 do grupo nutrido foi superior ao grupo desnutrido (N= 0,99 vs D= 0,84). Os animais que sofreram crises convulsivas apresentaram uma densidade de glias na região de CA3 inferior aos animais que não sofreram crises (CC= 0,72 vs s/CC= 1,11) com significância estatística (P=0,003). Os animais que foram expostos ao AE apresentaram uma densidade glial inferior em CA3 quando comparados aos animais que não foram expostos a esta estimulação (AE=0,79 vs s/AE=1,04), mas esta diferença não é estatisticamente significativa.

Tabela 10 – Significância Estatística para as comparações múltiplas^[1] entre as médias dos valores de densidade glial na região de CA3 do hipocampo entre os grupos estudados

Grupo/Médias	Grupo/Médias							
	N+CC	N+AE	N+CC+AE	D	D+CC	D+AE	D+CC+AE	
	0.79	1.05	0.82	1.32	0.74	0.76	0.52	
N	1.31	0.450	0.986	0.525	1.000	0.336	0.375	0.062
N+CC	0.79		0.961	1.000	0.412	1.000	1.000	0.959
N+AE	1.05			0.980	0.956	0.907	0.930	0.421
N+CC+AE	0.82				0.484	1.000	1.000	0.930
D	1.32					0.303	0.340	0.054
D+CC	0.74						1.000	0.987
D+AE	0.76							0.980

[1]: ANOVA oneway (F=x,xx; P=0,000) seguida de teste de *post-hoc* de Tukey. *: representa diferenças estatisticamente significativas para $\alpha=0,05$.

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido.

Densidade glial ca3

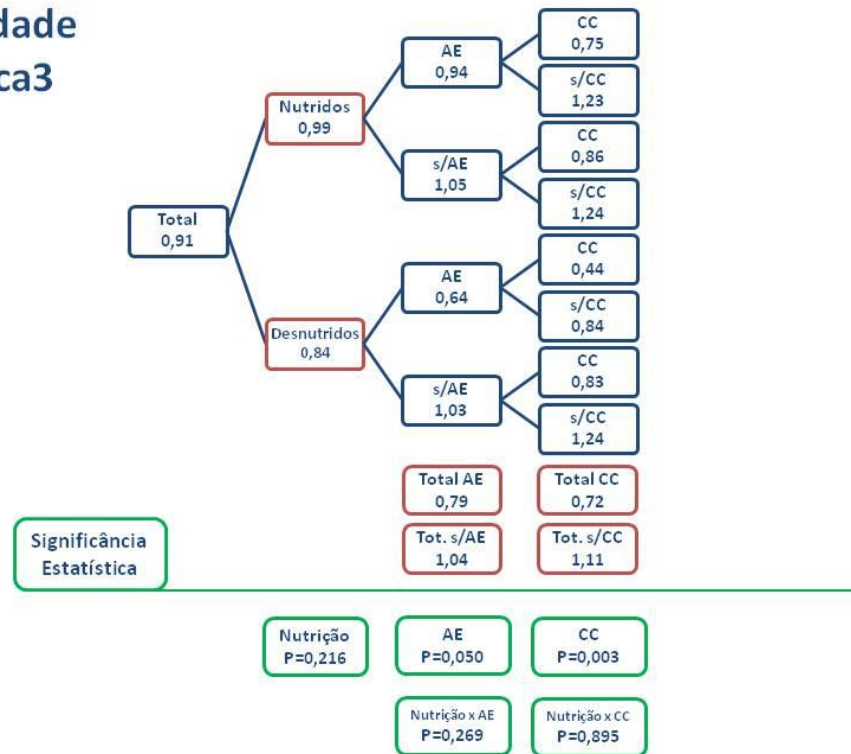


Figura 18. Fluxograma de valores médios (Médias estimadas marginais na ANCOVA) para densidade glial na região de CA3 para os grupos estudados (n= 6 para todos os grupos).

5.6 Espessura de CA1

A figura 19 e a tabela 11 mostram os valores para a espessura da região de CA1 considerando os fatores desnutrição, crise convulsiva e ambiente enriquecido. Não foram observadas alterações decorrentes do fator nutrição na espessura da região de CA1 (P=0,771). As crises convulsivas também parecem não influenciar na espessura da região de CA1 (P=0,895). O AE, por sua vez, parece influenciar na espessura da região de CA1, promovendo um aumento na espessura desta região (P= 0,004). Não foram observados efeitos de interação entre CC vs AE com a nutrição.

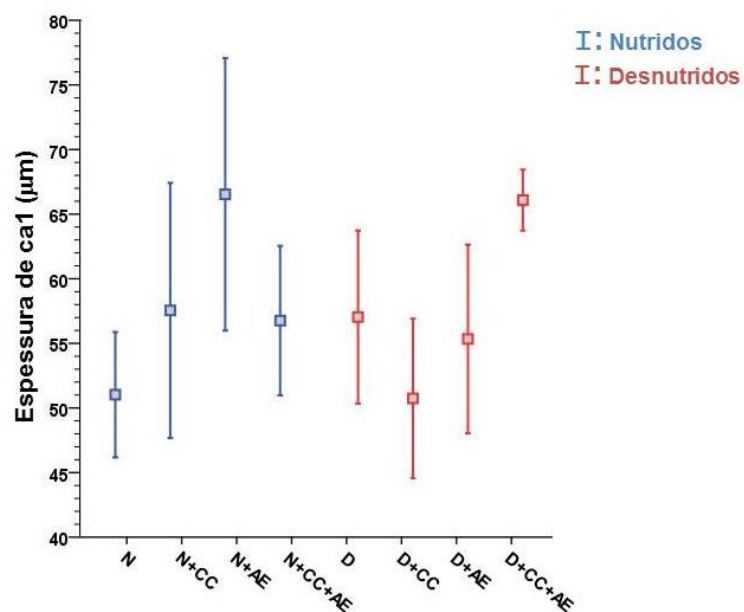


Figura 19 – Gráfico de média e desvio-padrão para os valores de espessura na região de CA1 do hipocampo segundo os grupos estudados (n= 6 para os grupos estudados).

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido.

Tabela 11. – Análise de covariância para a espessura na região de ca1 do hipocampo avaliando o efeito da nutrição (NUT), crises convulsivas (CC), ambiente enriquecido (AE) com fatores de interação para nutrição x crises convulsivas e nutrição x ambiente enriquecido em ratos wistar (n=40).

Fator	F	P	E/S
nutrição	0,086	0,771	
ambiente enriquecido	9,754	0,004	
crises convulsivas	0,018	0,895	
NUT x CC	0,720	0,402	
NUT x AE	0,014	0,907	

A tabela 12 e figura 20 mostram as médias e as significâncias estatísticas comparando todos os grupos. Observa-se que a média da espessura da região de CA1 do grupo nutrido foi levemente superior ao grupo desnutrido (N=57,97 vs D=57,30). Os animais que sofreram crises convulsivas apresentaram um leve aumento na espessura da região de CA1 quando comparados aos animais que não sofreram crises (CC=57,79 vs s/CC=57,48). Os animais que foram expostos ao AE, por sua vez, apresentaram um aumento significativo na espessura da região de CA1 quando comparados aos animais que não foram expostos a esta estimulação (AE=61,18 vs s/AE=54,09; P=0,004). A figura 21 mostra a região de CA1 de um rato nutrido controle e um rato nutrido exposto ao AE com magnificação de 40X pela videocâmera.

Tabela 12 – Significância Estatística para as comparações múltiplas^[1] entre as médias dos valores da espessura na região de CA1 do hipocampo entre os grupos estudados.

Grupo/Médias	Grupo/Médias							
	N+CC	N+AE	N+CC+AE	D	D+CC	D+AE	D+CC+AE	
Grupo/Médias	57.55	66.53	56.76	57.04	50.74	55.34	66.09	
N	51.03	0.629	0.004*	0.760	0.716	1.000	0.930	0.005*
N+CC	57.55	0.244	1.000	1.000	0.579	0.999	0.300	
N+AE	66.53		0.163	0.189	0.003*	0.072	1.000	
N+CC+AE	56.76			1.000	0.715	1.000	0.206	
D	57.04				0.668	1.000	0.236	
D+CC	50.74					0.905	0.004*	
D+AE	55.34						0.094	

[1]: ANOVA oneway (F=x,xx; P=0,000) seguida de teste de *post-hoc* de Tukey. *: representa diferenças estatisticamente significativas para $\alpha=0,05$.

Legenda:

N: nutridos; N+CC: nutridos com crise convulsiva; N+AE: nutridos com ambiente enriquecido; N+CC+AE: nutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido; D: desnutridos; D+CC: desnutridos com crise convulsiva; D+AE: desnutridos com ambiente enriquecido; D+CC+AE: desnutridos com crise convulsiva e ambiente enriquecido.

Espessura ca1

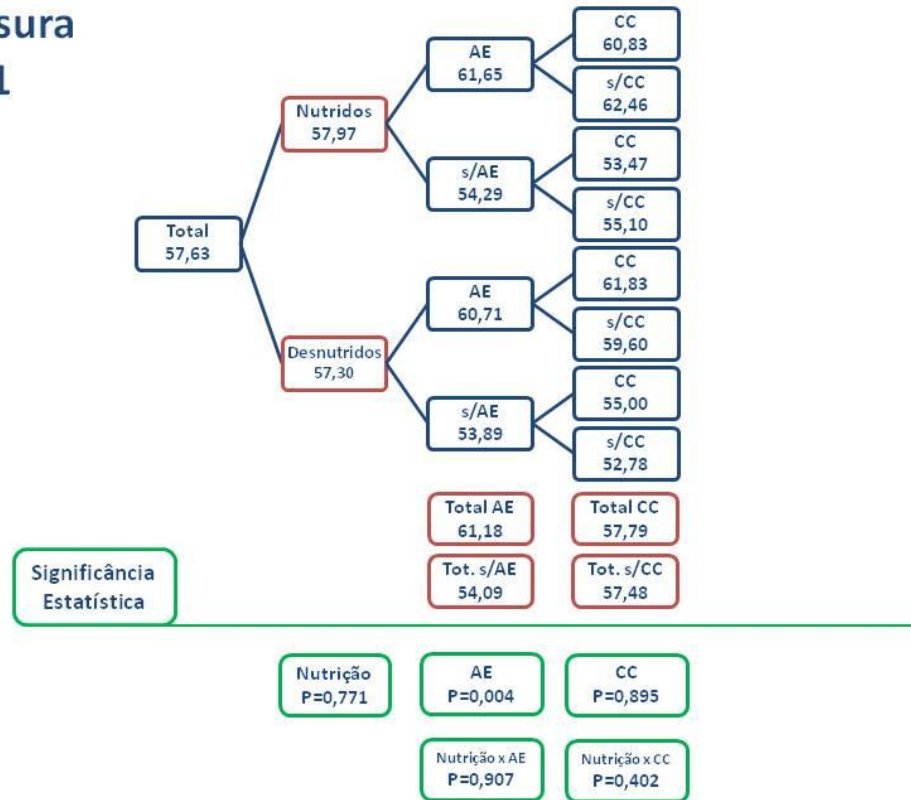
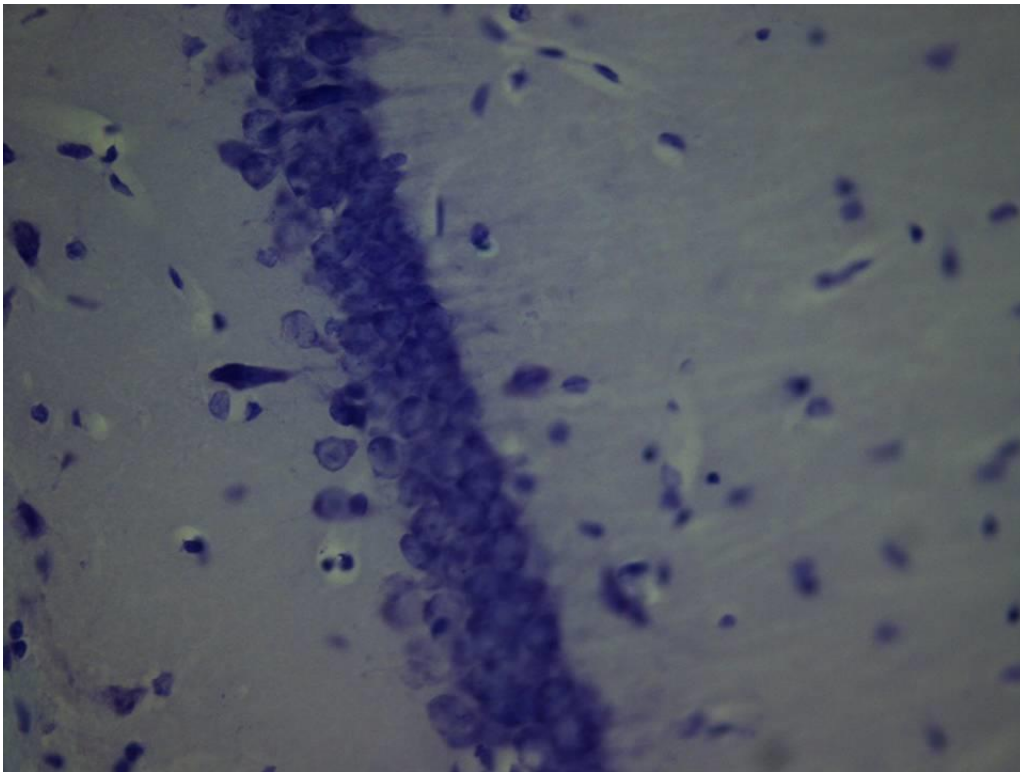
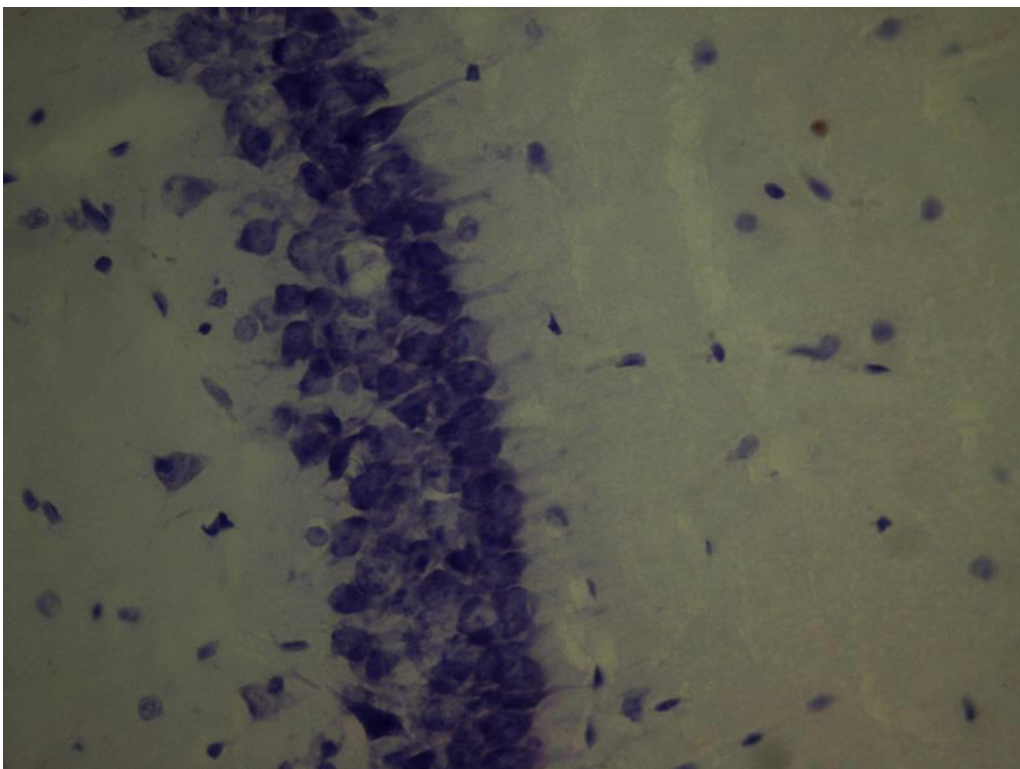


Figura 20. Fluxograma de valores médios para Espessura de CA1 para os grupos estudados (n= 6 para todos os grupos).

Figura 21

Amostra com magnitude de 40X pela videocâmara da espessura da região de CA1 de um rato nutrido controle



Amostra com magnitude de 40X pela videocâmara da espessura da região de CA1 de um rato nutrido com ambiente enriquecido

6 DISCUSSÃO

O presente estudo experimental teve com principal objetivo verificar os efeitos do ambiente enriquecido na morfometria do hipocampo de ratos submetidos a crises convulsivas e desnutrição no período neonatal. Além disso, objetivamos mensurar o volume, a densidade neuronal e glial nas regiões de CA1 e CA3, bem como a espessura da área em CA1 do hipocampo destes animais.

Os resultados do presente estudo demonstram que o paradigma de desnutrição entre o segundo (P2) e décimo quinto (P15) dias de vida do rato, apesar de não alterar o volume do hipocampo nem a espessura de CA1, promoveram uma diminuição da densidade neuronal em CA1 e CA3, bem como uma diminuição da densidade glial em CA1. As crises convulsivas, não influenciaram o volume do hipocampo, a espessura de CA1 e a densidades neuronal-de CA1 e CA3, entretanto, promoveram uma diminuição da densidade glial de CA1 e CA3. Por outro lado, animais submetidos ao ambiente enriquecido apresentaram um aumento do volume do hipocampo e da espessura de CA1, sem alterações na densidade neuronal de CA1 e CA3. . Estas contribuições sugerem que uma complexidade ambiental induz alterações morfológicas no cérebro que poderiam estar associadas com a melhora das funções cognitivas.

Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório demonstraram que o estado nutricional e crises convulsivas promovem alteração no aprendizado e memória (Hemb et al 2010; Simao et al 2012). Há um consenso na literatura vigente que o déficit de memória é uma das principais consequências cognitivas relacionadas com a desnutrição e epilepsia (Huang et al 2003; Morgane et al 2002).

Já no que tange às alteração morfológicas, foi realizado estudos da extensão da lesão em estruturas vulneráveis a epilepsia e desnutrição, as quais também são relacionadas com a neurobiologia da memória. O hipocampo é o principal objeto de estudo, pois se apresenta como alvo primário da lesão epiléptica e ao comportamento na desnutrição. O

hipocampo esta associado a diversas funções de aprendizagem e memória, incluindo o mapeamento espacial, a memória de trabalho (Olton 1977; Olton & Papas 1979), a aprendizagem espacial (Morris 1984) e a aprendizagem reversa (Berger et al 1983). O hipocampo contribui significativamente para o processamento de informações espaciais (Howard et al 1976; Morris et al 1983; Olton & Papas 1979). Dentro deste contexto, nosso trabalho não observou alteração de volume no hipocampo em animais desnutridos, mas uma diminuição da densidade neuronal na região de CA1 do hipocampo. Este dado permite evidenciar que a desnutrição durante o desenvolvimento tem efeitos adversos a longo prazo na função cognitiva vista por nosso grupo (Hemb ET AL., 2010; Simão ET AL., 2012) e estas alteração de memória podem ser refletidas na densidade neuronal no hipocampo.

A desnutrição promove alterações no hipocampo dos animais. Foi observado em um estudo realizado por Bayer (Bayer 1980) que os animais desnutridos apresentaram além de uma redução numérica na densidade di hipocampo, também uma diminuição na camada volumétrica das células Andrade e colaboradores demonstraram que todas as populações de neurônios que formam o hipocampo são afetados pela baixa ingestão proteica a longo prazo (Andrade et al 1995). Outros fatores não podem ser desconsiderados como possíveis causas subjacentes à degeneração neuronal observada em animais submetidos à desnutrição. Sabe-se que a interrupção da alimentação normal *per se* é um fator de estresse que provoca um aumento dos níveis plasmáticos de gliocorticoides (Garcia-Belenguer et al 1993), degeneração neuronal no hipocampo (Gould et al 1992; Sapolsky 1986).

Já foi visto que os efeitos das crises convulsivas e da carência nutricional em um cérebro em desenvolvimento lesam principalmente a região hipocampal com relatos de perda neuronal nas regiões de CA1, CA3 e giro dentado (Ben-Ari 1985; Garcias Da Silva et al 2004; Lukoyanov & Andrade 2000), disfunções nos neurotransmissores como o glutamato e em receptores (Levitsky & Strupp 1995; Marks et al 1996; Millan et al 1993), redução no numero de sinapses (Warren & Bedi 1984) e dendritos (Leuba & Rabinowicz 1979). Por outro lado, inúmeras alterações decorrentes da exposição ao ambiente enriquecido ja foram publicadas, como alterações nos neurotransmissores e receptores (Rosenzweig &

Bennett 1972), aumento de fatores neurotróficos (Young et al 1999), da neurogênese (Kempermann & Gage 1999; 2000; van Praag et al 2000), da gliogênese e arborização dendríticas (Nakamura et al 1999), da densidade sináptica (Ip et al 2002; Rosenzweig 1996) e da plasticidade neuronal (Pinaud et al 2001). Nosso trabalho mostrou que a desnutrição, apesar de não modificar o volume do hipocampo nem espessura de CA1 acarreta uma menor densidade neuronal em CA1 e CA3.

Andrade já havia descrito uma diminuição de células em regiões CA1 e CA3 do hipocampo de ratos secundária a uma desnutrição provocada no período neonatal no seguimento destes, observou que os efeitos permaneciam apesar da reabilitação nutricional (Andrade et al 1995; Diaz-Cintra et al 1994). Diaz-Cintra e colaboradores também mostram que a desnutrição proteica em período neonatal acarreta alterações morfológicas nas células piramidais de CA3, além da redução da densidade neuronal (Diaz-Cintra et al 1994.) Florian e colaboradores, por sua vez, viram que os animais desnutridos, quando comparados aos nutridos, apresentaram uma redução no número de neurônios na região de CA3, entretanto esta redução não foi encontrada em CA1 (Florian & Nunes 2011). Nossos resultados vão de acordo e reforçam estes dados da literatura.

Estudos prévios não demonstraram efeitos da reabilitação nutricional sobre as alterações morfológicas induzidas pela desnutrição (Andrade et al 1995). A reabilitação nutricional não previne a degeneração neuronal. Este grupo não encontrou nenhuma evidência de atrofia cerebral macroscópica no cérebro dos ratos desnutridos e é concebível que, a hipótese de que diminuição no peso cerebral ocorra devido a uma perda neuronal, possa ser atenuada pelos mecanismos de regeneração exibidos por neurônios sobreviventes (Coleman & Flood 1986; Diaz-Cintra et al 1994; Garcia-Ruiz et al 1993), bem como por um aumento no número de células gliais e alargamento dos seus processos desencadeados pela degeneração neuronal (Yu et al 1974). A redução da densidade neuronal e glial associados com volume relativamente normal do hipocampo sugere que a epilepsia e a desnutrição constituem um endosso da hipótese de que esses fatores afetam o desenvolvimento do cérebro durante o período neonatal. Deste modo, é possível que os efeitos deletérios da desnutrição em neurônios seja indireto, possivelmente mediada por efeitos em células

gliais. Pode-se especular que a baixa densidade glial pode estar associada com uma redução inicial de arborização de astrocíticos e encolhimento do domínio astrogliar, o que pode afetar a conectividade sináptica dentro da epilepsia e desnutrição, embora isto requiera investigação adicional utilizando técnicas de coloração imuno-histoquímica para caracterizar melhor as células gliais em passos diferentes durante o desenvolvimento.

Nos animais submetidos ao paradigma da desnutrição e crises convulsivas, foi observado um aumento na volumetria do hipocampo quando comparados ao grupo submetido somente ao paradigma de desnutrição. Da mesma forma, foi encontrado um leve aumento na média de densidade neuronal dos animais desnutridos submetidos a crises convulsivas. Estes aumentos podem ser decorrentes de edema cerebral secundário à esta associação deletéria entre desnutrição e crises convulsivas. Alguns estudos clínicos e experimentais demonstraram que as crises convulsivas, assim como as deficiências nutricionais são responsáveis por edema neuronal e cerebral assim como um aumento no peso cerebral em animais desnutridos (Almonte et al 1999; Andrew & MacVicar 1994; Briellmann et al 2005; Hemb et al 2010). Esta diminuição neuronal provocada pela desnutrição pode ser uma explicação para a redução no limiar para crises convulsivas nos animais desnutridos, bem como seu prejuízo cognitivo.

O efeito de aumento de volume hipocampal, pode estar associado com um resultado já encontrado por nosso grupo em que foi demonstrado que o ambiente enriquecido melhora a aprendizagem espacial e a memória de ratos submetidos aos paradigmas de desnutrição e crises convulsivas precoces (Faverjon et al 2002; Simao et al 2012; Vivinetto et al 2012). Em 1964, Altman, demonstrou que o enriquecimento ambiental acarreta, além de uma neurogênese, uma gliogênese (Altman & Das 1964). Roedores submetidos ao enriquecimento ambiental, apresentaram peso tamanho cerebral aumentados (Simao et al 2012). Inúmeras teorias cognitivas sobre o enriquecimento ambiental tem demonstrado seu efeito sobre o cérebro. Exercícios nos brinquedos, em especial na roda, demonstram um aumento da proliferação celular bem como a formação de novos neurônios no giro dentado (van Praag et al 1999).

O momento do início da privação de proteína é um fator determinante de seus efeitos sobre a estrutura do SNC (Austin et al 1992; Dobbing 1968; Morgane et al 1993). A vulnerabilidade é máxima quando o cérebro está se desenvolvendo, sendo que o período crítico é o chamado de "período de surto de crescimento do cérebro", que acontece na vida pós-natal precoce (Dobbing 1968). Os efeitos da desnutrição sobre o cérebro em desenvolvimento são particularmente bem caracterizados em roedores, com reduções no número de neurônios (Bedi 1991; Jordan et al 1982; Leuba & Rabinowicz 1979; West & Kemper 1976), empobrecimento das árvores dendríticas e diminuição do número de espinhas dendríticas (Diaz-Cintra et al 1991; Diaz-Cintra et al 1981; 1984; Diaz-Cintra et al 1990; Leuba & Rabinowicz 1979). Por outro lado, a má nutrição iniciada na vida adulta não tem sido considerado como sendo a causa provável de grandes alterações da estrutura do cérebro (Dobbing 1968; Morgane et al 1993).

Optamos pela utilização do modelo de desnutrição extra -uterina por já ter sido comprovada a sua eficácia em estudos anteriores (Nunes et al 2002; Nunes et al 2000). Além disso, quando comparadas as desnutrições intra- uterina e extra uterina não foi observada diferença significativa na contagem celular entre os grupos estudados em nenhuma região do hipocampo (Florian & Nunes 2011). Este achado é significativo no sentido de afastar a possibilidade do estresse da separação, que poderia ter sido causado eventualmente pelo modelo de desnutrição extra-uterina utilizado, ser responsável por uma diminuição da contagem celular por menor neurogênese ou maior apoptose celular, como demonstrado por Zhang e colaboradores, entre outros, em diferentes situações (King et al 2004; Mirescu et al 2004; Zhang et al 2002).

Sabe-se que um problema do paradigma extra -uterino é que a separação dos filhotes de suas mães pode ter outros efeitos além de desnutrição, como o estresse gerado nos filhotes devido à separação (Huang et al 2003). Todavia, até este efeito pode ser extrapolado para uma situação de desnutrição em humanos, tal como ocorre em neonatos prematuros com baixo peso de nascimento que permanecem por longos períodos em incubadora.

Em nosso estudo, tivemos o cuidado de manter todos os filhotes juntos durante a separação maternal em ambiente sem ruídos, com temperatura controlada e iluminação adequada; assim, podemos dizer que o estresse provocado foi, dentro do possível, reduzido. Estudos prévios sugerem que o contato, *per se*, é suficiente para prevenir o aumento do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) provocado pela separação maternal (Suchecki et al 1993; van Oers et al 1998).

As mudanças funcionais associadas ao enriquecimento ambiental, podem ser devidas não apenas a neurogênese melhorada, mas também ao aumento da sinaptogênese, gliogênese e angiogênese (Isaacs et al 1992; Volkmar & Greenough 1972). Além disso, em um estudo realizado pelo nosso grupo, observamos que o ambiente enriquecido foi capaz de reverter os danos secundários, a carência nutricional neonatal e os efeitos decorrentes do status epilepticus (Simao et al 2012). Nossas descobertas avançam significativamente para o entendimento dos efeitos do ambiente enriquecido sobre desnutrição e crises convulsivas no período neonatal. Estas observações apoiam a ideia de que o enriquecimento ambiental pode alterar a modificação estrutural e funcional da formação do hipocampo existente. Foram observados aumento nas espinhas dendríticas (Globus et al 1973), fibras mielinizadas (Qiu et al 2012), a complexidade da ramificação dendrítica (Greenough et al 1973) pode ser a base muitas das mudanças morfológicas encontradas no os cérebros dos animais exposto a um ambiente enriquecido.

Pode-se concluir, portanto, que a privação materna em ratos neonatos a longo prazo promove alterações na organização estrutural da formação do hipocampo e, além disso, que as populações neuronais afetadas não são restaurados após o restabelecimento materno. Conseqüentemente, alterações estruturais da formação do hipocampo (Zimmer et al, 1983; Amaral & Witter, 1989), podem ser irreversivelmente danificadas. As implicações funcionais e comportamentais destas alterações foram claras nos estudos anteriores de nosso grupo (Hemb et al 2010; Simao et al 2012), sendo que as funções cognitivas, incluindo a aprendizagem e a memória, podem ser irreversivelmente danificadas (Hemb et al 2010; Morgane et al 1993; Simao et al 2012) A estimulação com o ambiente enriquecido foi suficiente para alterar a estrutura da formação hipocampal, e conseqüentemente reverter a

carência nutricional neonatal e os efeitos decorrentes de crises convulsivas, melhorando as funções cognitivas em ratos adultos (Simao et al 2012).

CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

1. O ambiente enriquecido promove modificações na morfometria de subregiões do hipocampo em ratos adultos que foram submetidos precocemente a desnutrição e/ou crises convulsivas precoces

2. A desnutrição e as crises convulsivas *per se* não parecem influenciar a volumetria do hipocampo. O Ambiente Enriquecido promove aumento no volume.

3. A desnutrição diminui a densidade neuronal e glial da região de CA1 e também promove uma diminuição da densidade neuronal de CA3. As crises convulsivas provocam uma redução na densidade glial de CA1 e também provocam uma redução na densidade neuronal de CA3. O ambiente enriquecido não parece influenciar a densidade neuronal e glial na região de CA1, mas promove, entretanto, uma redução na densidade glial de CA3.

4. A desnutrição e as crises convulsivas não influenciam na espessura da região de CA1 do hipocampo. O Ambiente Enriquecido, por sua vez, promove um aumento na espessura de CA1

REFERÊNCIAS

- Akman C, Zhao Q, Liu X, Holmes GL. 2004. Effect of food deprivation during early development on cognition and neurogenesis in the rat. *Epilepsy Behav* 5:446-54
- Almeida SS, Duntas LH, Dye L, Nunes ML, Prasad C, et al. 2002. Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. *Nutr Neurosci* 5:311-20
- Almonte RA, Heath DL, Whitehall J, Russell MJ, Patole S, Vink R. 1999. Gestational magnesium deficiency is deleterious to fetal outcome. *Biol Neonate* 76:26-32
- Altman J, Das GD. 1964. Autoradiographic Examination of the Effects of Enriched Environment on the Rate of Glial Multiplication in the Adult Rat Brain. *Nature* 204:1161-3
- Amaral OB, Vargas RS, Hansel G, Izquierdo I, Souza DO. 2008. Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiol Behav* 93:388-94
- Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. 1995. Effects of long-term malnutrition and rehabilitation on the hippocampal formation of the adult rat. A morphometric study. *J Anat* 187 (Pt 2):379-93
- Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. 1998. Differential vulnerability of the subiculum and entorhinal cortex of the adult rat to prolonged protein deprivation. *Hippocampus* 8:33-47
- Andrew RD, MacVicar BA. 1994. Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience* 62:371-83
- Austin-Lafrance RJ, Morgane PJ, Bronzino JD. 1991. Prenatal protein malnutrition and hippocampal function: rapid kindling. *Brain Res Bull* 27:815-8
- Austin KB, Beiswanger C, Bronzino JD, Austin-Lafrance RJ, Galler JR, Morgane PJ. 1992. Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus. *Brain Res Bull* 28:245-55
- Bayer SA. 1980. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* 190:87-114
- Bedi KS. 1991. Early-life undernutrition causes deficits in rat dentate gyrus granule cell number. *Experientia* 47:1073-4
- Belayev A, Saul I, Liu Y, Zhao W, Ginsberg MD, et al. 2003. Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 964:121-7
- Ben-Ari Y. 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14:375-403
- Bennett JC, McRae PA, Levy LJ, Frick KM. 2006. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol Learn Mem* 85:139-52
- Berger TW, Rinaldi PC, Weisz DJ, Thompson RF. 1983. Single-unit analysis of different hippocampal cell types during classical conditioning of rabbit nictitating membrane response. *J Neurophysiol* 50:1197-219

- Biernaskie J, Corbett D. 2001. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J Neurosci* 21:5272-80
- Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, et al. 2008. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet* 371:243-60
- Briellmann RS, Wellard RM, Jackson GD. 2005. Seizure-associated abnormalities in epilepsy: evidence from MR imaging. *Epilepsia* 46:760-6
- Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Morgane PJ. 1990. Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. *Brain Res* 515:45-50
- Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Siok CJ, Morgane PJ. 1986. Effect of protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioral measures. *Brain Res* 384:348-54
- Bryce J, Coitinho D, Darnton-Hill I, Pelletier D, Pinstrup-Andersen P. 2008. Maternal and child undernutrition: effective action at national level. *Lancet* 371:510-26
- Burneo JG, Tellez-Zenteno J, Wiebe S. 2005. Understanding the burden of epilepsy in Latin America: a systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Res* 66:63-74
- Cabral FR, Priel MR, Silva Araujo BH, Brito Torres L, de Lima E, et al. 2011. Malnutrition in infancy as a susceptibility factor for temporal lobe epilepsy in adulthood induced by the pilocarpine experimental model. *Dev Neurosci* 33:469-78
- Carlton WW, Kelly WA. 1969. Neural lesions in the offspring of female rats fed a copper-deficient diet. *J Nutr* 97:42-52
- Cherubini E, Ben-Ari Y, Krnjevic K. 1989. Anoxia produces smaller changes in synaptic transmission, membrane potential, and input resistance in immature rat hippocampus. *J Neurophysiol* 62:882-95
- Coleman PD, Flood DG. 1986. Dendritic proliferation in the aging brain as a compensatory repair mechanism. *Prog Brain Res* 70:227-37
- Cornaggia CM, Beghi M, Provenzi M, Beghi E. 2006. Correlation between cognition and behavior in epilepsy. *Epilepsia* 47 Suppl 2:34-9
- Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR. 1964. The Effects of an Enriched Environment on the Histology of the Rat Cerebral Cortex. *J Comp Neurol* 123:111-20
- Diaz-Cintra S, Cintra L, Galvan A, Aguilar A, Kemper T, Morgane PJ. 1991. Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J Comp Neurol* 310:356-64
- Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Resnick O, Morgane PJ. 1981. The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res* 221:243-55
- Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Resnick O, Morgane PJ. 1984. The effects of protein deprivation on the nucleus locus coeruleus: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res* 304:243-53
- Diaz-Cintra S, Cintra L, Ortega A, Kemper T, Morgane PJ. 1990. Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. *J Comp Neurol* 292:117-26
- Diaz-Cintra S, Garcia-Ruiz M, Corkidi G, Cintra L. 1994. Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res* 662:117-26

- Dobbing J. 1968. Vulnerable periods in developing brain. In *Applied Neurochemistry*, ed. ANDJ Dobbing, pp. 287- 316. Philadelphia: F.A. Davis
- Dobbing J, Hopewell JW, Lynch A. 1971. Vulnerability of developing brain. VII. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. *Exp Neurol* 32:439-47
- Dobbing J, Sands J. 1981. Vulnerability of developing brain not explained by cell number/cell size hypothesis. *Early Hum Dev* 5:227-31
- Engel J, Jr. 2006. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Res* 70 Suppl 1:S5-10
- Faverjon S, Silveira DC, Fu DD, Cha BH, Akman C, et al. 2002. Beneficial effects of enriched environment following status epilepticus in immature rats. *Neurology* 59:1356-64
- Fernandes J. 1993. Epidemiology of epileptic syndromes in Porto Alegre: a populational study. *Universidade Federal do Rio grande do Sul*
- Florian ML, Nunes ML. 2011. Effects of intra-uterine and early extra-uterine malnutrition on seizure threshold and hippocampal morphometry of pup rats. *Nutr Neurosci* 14:151-8
- Forsgren L. 2004. Incidence and prevalence. In *Epilepsy in children*. London: Arnold
- Frick KM, Fernandez SM. 2003. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging* 24:615-26
- Fukuda MT, Francolin-Silva AL, Almeida SS. 2002. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. *Behav Brain Res* 133:271-7
- Garcia-Belenguer S, Oliver C, Mormede P. 1993. Facilitation and feedback in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during food restriction in rats. *J Neuroendocrinol* 5:663-8
- Garcia-Ruiz M, Diaz-Cintra S, Cintra L, Corkidi G. 1993. Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res* 625:203-12
- Garcias Da Silva LF, Nunes ML, Da Costa JC. 2004. Risk factors for developing epilepsy after neonatal seizures. *Pediatr Neurol* 30:271-7
- Globus A, Rosenzweig MR, Bennett EL, Diamond MC. 1973. Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J Comp Physiol Psychol* 82:175-81
- Gobbo OL, O'Mara SM. 2004. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav Brain Res* 152:231-41
- Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS. 1992. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* 12:3642-50
- Grantham-McGregor S, Cheung YB, Cueto S, Glewwe P, Richter L, Strupp B. 2007. Developmental potential in the first 5 years for children in developing countries. *Lancet* 369:60-70
- Greenough WT, Volkmar FR, Juraska JM. 1973. Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Exp Neurol* 41:371-8
- Guerreiro CAM, Guerreiro, M.M., Cendes, F., et al. . 2000. *Epilepsia*. São Paulo: Lemos

- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, et al. 1988a. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:857-81
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, et al. 1988b. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:379-94
- Gundersen HJ, Jensen EB. 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147:229-63
- Hall A, Khanh LN, Son TH, Dung NQ, Lansdown RG, et al. 2001. An association between chronic undernutrition and educational test scores in Vietnamese children. *Eur J Clin Nutr* 55:801-4
- Hemb M, Cammarota M, Nunes ML. 2010. Effects of early malnutrition, isolation and seizures on memory and spatial learning in the developing rat. *Int J Dev Neurosci* 28:303-7
- Hoffmann AF, Zhao Q, Holmes GL. 2004. Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the "two-hit hypothesis". *Epilepsy Behav* 5:873-7
- Holmes GL. 2004. Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10:101-5
- Howard E, Olton DS, Johnson CT. 1976. Active avoidance and brain DNA after postnatal food deprivation in rats. *Dev Psychobiol* 9:217-21
- Huang LT, Holmes GL, Lai MC, Hung PL, Wang CL, et al. 2002. Maternal deprivation stress exacerbates cognitive deficits in immature rats with recurrent seizures. *Epilepsia* 43:1141-8
- Huang LT, Lai MC, Wang CL, Wang CA, Yang CH, et al. 2003. Long-term effects of early-life malnutrition and status epilepticus: assessment by spatial navigation and CREB(Serine-133) phosphorylation. *Brain Res Dev Brain Res* 145:213-8
- Ip EY, Giza CC, Griesbach GS, Hovda DA. 2002. Effects of enriched environment and fluid percussion injury on dendritic arborization within the cerebral cortex of the developing rat. *J Neurotrauma* 19:573-85
- Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Black JE, Greenough WT. 1992. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:110-9
- Iso H, Simoda S, Matsuyama T. 2007. Environmental change during postnatal development alters behaviour, cognitions and neurogenesis of mice. *Behav Brain Res* 179:90-8
- Johansson BB, Belichenko PV. 2002. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:89-96
- Jordan TC, Howells KF, McNaughton N, Heatlie PL. 1982. Effects of early undernutrition on hippocampal development and function. *Res Exp Med (Berl)* 180:201-7
- Kempermann G, Gage FH. 1999. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus* 9:321-32
- Kempermann G, Gage FH. 2000. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp* 231:220-35; discussion 35-41, 302-6
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-5

- King RS, DeBassio WA, Kemper TL, Rosene DL, Tonkiss J, et al. 2004. Effects of prenatal protein malnutrition and acute postnatal stress on granule cell genesis in the fascia dentata of neonatal and juvenile rats. *Brain Res Dev Brain Res* 150:9-15
- Koh S, Chung H, Xia H, Mahadevia A, Song Y. 2005. Environmental enrichment reverses the impaired exploratory behavior and altered gene expression induced by early-life seizures. *J Child Neurol* 20:796-802
- Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS. 2005. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke* 36:1278-82
- Kramer MS, Kakuma R. 2003. Energy and protein intake in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*:CD000032
- Krech D, Rosenzweig MR, Bennett EL. 1960. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. *J Comp Physiol Psychol* 53:509-19
- Leuba G, Rabinowicz T. 1979. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. II. Evolution of dendritic branchings and spines in the visual region. *Exp Brain Res* 37:299-308
- Levitsky DA, Strupp BJ. 1995. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J Nutr* 125:2212S-20S
- Liu Z, Stafstrom CE, Sarkisian M, Tandon P, Yang Y, et al. 1996. Age-dependent effects of glutamate toxicity in the hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 97:178-84
- Liu Z, Yang Y, Silveira DC, Sarkisian MR, Tandon P, et al. 1999. Consequences of recurrent seizures during early brain development. *Neuroscience* 92:1443-54
- Logroscino G, Hesdorffer DC, Cascino G, Annegers JF, Hauser WA. 2001. Time trends in incidence, mortality, and case-fatality after first episode of status epilepticus. *Epilepsia* 42:1031-5
- Lombroso CT. 1983. Prognosis in neonatal seizures. *Adv Neurol* 34:101-13
- Lombroso CT. 1996a. Neonatal seizures: a clinician's overview. *Brain Dev* 18:1-28
- Lombroso CT. 1996b. Neonatal seizures: historic note and present controversies. *Epilepsia* 37 Suppl 3:5-13
- Lombroso CT, Nunes, M.L., Da Costa, J.C. 1998. Crises convulsivas no recém-nascido. In *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias*, ed. JC Da Costa, Palmini, A., Yacubian, E.M., Cavalheiro, E.A., pp. 173-201. São Paulo: Lemos
- Lukoyanov NV, Andrade JP. 2000. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behav Brain Res* 112:85-97
- Manacero SA, Marschik PB, Nunes ML, Einspieler C. 2012. Is it possible to predict the infant's neurodevelopmental outcome at 14 months of age by means of a single preterm assessment of General Movements? *Early Hum Dev* 88:39-43
- Marks JD, Friedman JE, Haddad GG. 1996. Vulnerability of CA1 neurons to glutamate is developmentally regulated. *Brain Res Dev Brain Res* 97:194-206
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B. 2004. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 27:589-94
- McCabe BK, Silveira DC, Cilio MR, Cha BH, Liu X, et al. 2001. Reduced neurogenesis after neonatal seizures. *J Neurosci* 21:2094-103
- Mello E. 2005. Recuperação do desnutrido. In *Pediatria: Diagnóstico e tratamento*, ed. JS Ferreira, pp. 141-6. Porto Alegre: Artmed

- Millan MH, Chapman AG, Meldrum BS. 1993. Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Res* 14:139-48
- Mirescu C, Peters JD, Gould E. 2004. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 7:841-6
- Mohammed AH, Henriksson BG, Soderstrom S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR. 1993. Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav Brain Res* 57:183-91
- Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, et al. 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 17:91-128
- Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 26:471-83
- Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60
- Morris R, Wheatley J, Britton P. 1983. Retrieval from long-term memory in senile dementia; cued recall revisited. *Br J Clin Psychol* 22 (Pt 2):141-2
- Nairismagi J, Pitkanen A, Kettunen MI, Kauppinen RA, Kubova H. 2006. Status epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: a histologic and MRI study. *Epilepsia* 47:479-88
- Nakamura H, Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S. 1999. Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. *J Neurosci Res* 56:307-15
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7:697-709
- Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistella V. 2002. [Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats]. *J Pediatr (Rio J)* 78:39-44
- Nunes ML, Liptakova S, Veliskova J, Sperber EF, Moshe SL. 2000. Malnutrition increases dentate granule cell proliferation in immature rats after status epilepticus. *Epilepsia* 41 Suppl 6:S48-52
- Olton DS. 1977. Spatial memory. *Sci Am* 236:82-4, 9-94, 6, 8
- Olton DS, Papas BC. 1979. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17:669-82
- Paglioli E, Palmi A, da Costa JC, Portuguese M, Martinez JV, et al. 2004. Survival analysis of the surgical outcome of temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 45:1383-91
- Palencia G, Calvillo M, Sotelo J. 1996. Chronic malnutrition caused by a corn-based diet lowers the threshold for pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *Epilepsia* 37:583-6
- Paxinos G, Watson, C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press
- Pinaud R, Penner MR, Robertson HA, Currie RW. 2001. Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment: implications for molecular plasticity. *Brain Res Mol Brain Res* 91:50-6
- Puurunen K, Koistinaho J, Sirvio J, Jolkkonen J, Sivenius J. 2001. Enriched-environment housing increases neuronal Fos-staining in the dentate gyrus after a water maze spatial learning task. *Neuropharmacology* 40:440-7

- Qiu X, Huang CX, Lu W, Yang S, Li C, et al. 2012. Effects of a 4 month enriched environment on the hippocampus and the myelinated fibers in the hippocampus of middle-aged rats. *Brain Res* 1465:26-33
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kiyin M, Tsien JZ. 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3:238-44
- Risedal A, Mattsson B, Dahlqvist P, Nordborg C, Olsson T, Johansson BB. 2002. Environmental influences on functional outcome after a cortical infarct in the rat. *Brain Res Bull* 58:315-21
- Riviello P, de Rogalski Landrot I, Holmes GL. 2002. Lack of cell loss following recurrent neonatal seizures. *Brain Res Dev Brain Res* 135:101-4
- Rosenzweig MR. 1996. Aspects of the search for neural mechanisms of memory. *Annu Rev Psychol* 47:1-32
- Rosenzweig MR, Bennett EL. 1972. Cerebral changes in rats exposed individually to an enriched environment. *J Comp Physiol Psychol* 80:304-13
- Rotta LN, Schmidt AP, Mello e Souza T, Nogueira CW, Souza KB, et al. 2003. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem Res* 28:1181-6
- Samlowski WE, Wiebke G, McMurry M, Mori M, Ward JH. 1998. Effects of total parental nutrition (TPN) during high-dose interleukin-2 treatment for metastatic cancer. *J Immunother* 21:65-74
- Sankar R, Shin DH, Liu H, Mazarati A, Pereira de Vasconcelos A, Wasterlain CG. 1998. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci* 18:8382-93
- Sapolsky RM. 1986. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus. Temporal aspects of synergy with kainic acid. *Neuroendocrinology* 43:440-4
- Schmitz C, Hof PR. 2005. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130:813-31
- Simao F, Porto JA, Nunes ML. 2012. Effects of enriched environment in spatial learning and memory of immature rats submitted to early undernourish and seizures. *Int J Dev Neurosci* 30:363-7
- Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S. 1993. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res* 75:185-92
- Taber KH, Fuller GN, Stanley JC, DeFrance JF, Wiggins RC. 1980. The effect of postnatal undernourishment on epileptiform kindling of dorsal hippocampus. *Experientia* 36:69-70
- Tuor UI, Hudzik TJ, Malisza K, Sydserff S, Kozlowski P, Del Bigio MR. 2001. Long-term deficits following cerebral hypoxia-ischemia in four-week-old rats: correspondence between behavioral, histological, and magnetic resonance imaging assessments. *Exp Neurol* 167:272-81
- Valadares CT, Fukuda MT, Francolin-Silva AL, Hernandez AS, Almeida SS. 2010. Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. *Nutr Neurosci* 13:274-82
- van Oers HJ, de Kloet ER, Whelan T, Levine S. 1998. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J Neurosci* 18:10171-9
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-70

- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191-8
- Veliskova J, Velisek L, Nunes ML, Moshe SL. 1996. Developmental regulation of regional functionality of substantial nigra GABAA receptors involved in seizures. *Eur J Pharmacol* 309:167-73
- Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, et al. 2008. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet* 371:340-57
- Vivinetto AL, Suarez MM, Rivarola MA. 2012. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behav Brain Res*
- Volkmar FR, Greenough WT. 1972. Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science* 176:1445-7
- Warren MA, Bedi KS. 1984. A quantitative assessment of the development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats. *J Comp Neurol* 227:104-8
- Wasterlain CG. 1976. Effects of neonatal status epilepticus on rat brain development. *Neurology* 26:975-86
- West CD, Kemper TL. 1976. The effect of a low protein diet on the anatomical development of the rat brain. *Brain Res* 107:221-37
- White HS. 2002. Animal models of epileptogenesis. *Neurology* 59:S7-S14
- Yan X, Polo Carbayo JJ, Weibel ER, Hsia CC. 2003. Variation of lung volume after fixation when measured by immersion or Cavalieri method. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L242-5
- Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ. 1999. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 5:448-53
- Yu MC, Lee JC, Bakay L. 1974. The ultrastructure of the rat central nervous system in chronic undernutrition. *Acta Neuropathol* 30:197-210
- Zhang LX, Levine S, Dent G, Zhan Y, Xing G, et al. 2002. Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 133:1-11

ANEXOS**Artigo submetido para a revista *CNS Neuroscience & Therapeutics***

27-May-2013

Dear Dr Simão:

Your manuscript entitled "Stereological analysis of the effects of enriched environment in the hippocampus of rats submitted to undernourishment and seizures during early life." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in *CNS Neuroscience & Therapeutics*.

Your manuscript ID is CNSNT-2013-153.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/cnsdr> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/cnsdr>.

Thank you for submitting your manuscript to *CNS Neuroscience & Therapeutics*.

Best wishes,

Buddy Zhou

CNS Neuroscience & Therapeutics

Stereological analysis of the effects of enriched environment in the hippocampus of rats submitted to undernourishment and seizures during early life.

Paula Steffen Alvarez¹, Fabrício Simão^{1*}, Marta Hemb¹, Léder Leal Xavier², Magda Lahorgue Nunes^{1,3}

¹ Neuroscience Laboratory, Institute of Biomedical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

² Laboratory of Tissue Biology, Department of Morphological and Physiological Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

³ School of Medicine and Brain Institute (InsCer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

Running Title: Enriched environment promotes hippocampal changes.

Corresponding author:

***Dr. Fabrício Simão**

Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas

Av. Ipiranga 6690, 2º andar

90610-000 Porto Alegre-RS, Brazil

Phone: + 55 51 33203318, FAX: + 55 51 33203316

E-mail: simaof@gmail.com

Summary

Background and Aim: It has been recently shown that enriched environment led to a significant benefit in learning and retention of visual-spatial memory, being able to reverse the cognitive impairment generated by undernourishment and seizures. Considering the role of hippocampus in memory/learning, we investigated the effects of enriched environment on the stereologic analysis in the hippocampus of rats submitted to recurrent seizures and undernourishment early in life. **Methods:** Pups were maintained on a nutritional deprivation regimen from post-natal day 2 (P2) to P15. From P8 to P10, pups were exposed to three recurrent seizures per day induced by flurothyl. Next, animals were exposed to enriched environment between P21 and P51. **Results:** Our data showed that undernourishment during early development decreased neuronal density in CA1 and CA3 subfields, as well as glial density in CA1. Additionally, recurrent seizures promoted a decrease in the glial density in CA1 and CA3, which indicate that both cell types are sensitive to the structural changes related to undernourishment and seizures. Animals submitted to the enriched environment showed an increased hippocampal volume and thickness of CA1. **Conclusions:** These observations support the view that enrich environment may change the structural and functional modification of existing hippocampus formation.

Keywords: undernourishment, recurrent seizures, enriched environment, hippocampus, stereology.

Introduction

An inadequate diet during early life has the potential to influence adversely in brain development, which is genetically programmed to grow faster than the rest of the body, resulting in changes to its structure and hence functioning [1-3]. Undernourishment has been recognized to cause reductions in the numbers of neurons, synapses, dendritic arborization, and myelination, all of which result in decreased brain size [3-8]. All these central nervous system (CNS) alterations are associated with delays in motor and cognitive functions [3,9,10].

Epilepsy is a common neurological disorder that occurs more frequently in children than in adults [11]. In addition, seizures during early development may be more detrimental than when occurring during adulthood [12]. The extent that prolonged seizure activity, i.e. status epilepticus (SE) and repeated seizures affect neuronal structure and function in the immature brain has been the subject of increasing clinical and experimental research.

Animal studies have demonstrated that the pathophysiological consequences of seizures in the developing brain can be associated with later cognitive and behavioral disturbances, which may be associated with hippocampal dysfunction [13-16]. Recurrent or prolonged seizures during the neonatal period have been shown to reduce brain cell number [17], synaptic reorganization with aberrant growth [18,19], suppression of dendrite growth [20] and glutamatergic synapses [21].

The enriched environment (EE) is best conceptualized as a combination of social interaction, physical exercises and continued exposure to learning opportunities, which may alter brain structure and functions in rodents [22-26]. Experimental studies suggested that EE stimulates neuronal plasticity, facilitate learning and reduces cognitive impairment in animals with preliminary brain injury [27]. Our group showed that EE was an effective treatment in the recovery of spatial memory in rats exposed to early undernutrition and seizures, being able to reverse the cognitive damage generated by these disorders [28]. Considering that environmental stimulation results in structural changes in neural cells to promote better cognitive outcome, it is reasonable to suggest that it could influence the hippocampal structures.

The association of undernourishment and seizures, which is not an uncommon clinical situation, might augment the deleterious effects of seizures in the developing brain. Little attention has been given to the influence of environmental enrichment in immature rats

with recurrent seizures and undernourishment in brain structures. To investigate this issue, the aim of this study was to evaluate the effect of an enriched environment in the hippocampus related to neuron and glial densities, thickness of pyramidal stratum of the CA1 subfield and total hippocampus volume in rats submitted to undernourishment and repeated seizures in the neonatal period.

Methods

Experimental Procedures

The experiments were conducted under conditions approved by the Scientific and Research Ethics Committees of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) regarding animal welfare. Pregnant female Wistar rats from our breeding colony were maintained on a 12-h dark–light cycle with food and water freely available. After delivery, each dam with the litter was housed individually. Each litter was culled to 10 pups. The day of birth was counted as P0. All animals were weaned at P21. The entire litters were randomly divided in 8 groups, conditions using only male pups in the following groups: N (nourished); N+EE (nourished + enriched environmental); N+RS (nourished + recurrent seizures), N+EE+RS (nourished + enriched environmental + recurrent seizures); U (undernourished); U+EE (undernourished + enriched environmental); U+RS (undernourished + recurrent seizures); U+RS+EE (undernourished + recurrent seizures + enriched environmental).

Undernourishment Paradigm

The undernourishment paradigm consisted of limiting the offspring's access to nutrition by removing the dams from the cage starting at P2. The deprivation period was increased by 2 h for 6 consecutive days, from 2 h on P2 to 12 h on P7. The deprivation period remained at 12 h/day for the next 8 days (P8–P15). During deprivation, pups remained in a light heated cage, with room temperature maintained at 34 °C (measured with a thermometer placed in the room). After the deprivation period, the pups were housed with their respective dams. Age-matched control rats remained with their dams [7, 29-32].

Flurothyl-Induced Seizures

To provoke early recurrent seizures, we used flurothyl [bis(2,2,2-trifluoroethyl)ether] (99%), a volatile convulsive agent that rapidly stimulates the central nervous system (CNS), inducing generalized seizures [33]. Animals were challenged with Flurothyl (20 μ L/min constant flow rate) in an air-tight chamber (9.38 L) to provoke recurrent seizures. Animals were submitted to recurrent seizures-3 exposures of flurothyl per day (1 h inter-exposure interval) from P8 to P10, until the appearance of the first clonic seizure. For all animals, the exposure to flurothyl took place immediately after separation from their dams.

Environment Enrichment (EE)

To test whether a period in an enriched environment has a beneficial effect following recurrent seizures and undernourishment, animals were exposed to this situation between P21 and P51. The enriched environment consisted of a large plastic cage measuring 100 cm (length) \times 50 cm (width) \times 40 cm (height) with various toys, wooden blocks, climbing platforms, plastic tubes, small shelters, and a running wheel. These objects were rearranged every week to facilitate exploratory behavior [28]. Enriched rats were housed in groups of 7–10, which permitted extensive social interactions between cagemates. The nonenriched group remained in plastic cages but were handled the same amount of time as the enriched group.

Brain Histology

For histology, all rats were deeply anesthetized with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) (i.p.) and injected with heparin (1,000 IU; Cristalia, Brazil). Using a peristaltic pump, the animals were perfused through the left cardiac ventricle with 200 mL of saline solution followed by 200 mL of fixative solution of 4 % paraformaldehyde (Reagen, Brazil) diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were extracted from the skull, post-fixed for 4 h in the same fixative solution at room temperature, cryoprotected in 30 % sucrose solution in PB at 4 $^{\circ}$ C until they sank and then frozen in liquid nitrogen. After these procedures, the brains were kept in a freezer (-70 $^{\circ}$ C) for further analyses. Coronal brain sections (20 μ m) were obtained using a cryostat (Leica, Germany) and one in every 10 sections was collected for analysis [34].

Hippocampal Volume

The morphometric evaluation of the brain was performed following the method of counting points. Slides with coronal sections were overlaid onto graph paper (grid points) and imaged using a Stereomicroscope Zeiss loupe, model Stemi SV 6. All points, which have reached every section of the hippocampus, were counted and used to calculate the volume. The volume was calculated using the following equation: $V = T \cdot a/p \cdot \Sigma P$, where V = estimation volume; T = distance between the analyzed points; a/p = point area (1 mm^2) and ΣP = sum of overlapped points on the image [35].

Neuronal and Glial Densities

To perform the stereological analysis of the hippocampus were selected the CA1 and CA3 regions, because both areas are sensitive to injury and cognitive deficits related to early recurrent seizures and undernourishment [19,36,37]. The histological study was conducted with a microscope Olympus, model BX51 bright field with a CCD camera coupled (Qimaging, model MicroPublisher 3.3 RTV) equipped with immersion oil lenses of 5, 10, 40 and 100x). The areas of interest were selected after low magnification (40x). The selected images were scanned at fixed aperture (40x) by Peltier CCD system (Image Pro Plus Capture Media Cybernetics USA). The neuronal count was performed using the two-dimensional quantitative system for test points created by Image Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics Capture, USA). The QA (number of neurons counted in the test area) was the number of neuronal bodies seen in only one focus, when they are fully or partially within the study region. For each hippocampus, five random dissector pairs were counted for CA1 and CA3 regions. Neurons were distinguished from glial cells because the former have nuclei with distinct nucleoli and a large mean nuclear diameter with a fair amount of chromatin, whereas glial cells have smaller nuclei with little chromatin on a clear background [38]. In each section, a grid composed was positioned over the right and left hippocampi in a dissector with $0,03776 \mu\text{m}^3$ of area. To obtain an impartial counting we used a grid with two prohibited lines (exclusion) and two acceptable lines (inclusion); when the "object" touched the forbidden lines it could not be counted, however, when touching the acceptable lines or were placed completely within the allowed area, it was counted [39].

Hippocampal Thickness

Using the same slices in which cell densities were evaluated, analyses of the thicknesses of the hippocampal layer of CA1 was performed. The thicknesses were measured with the aid of an eyepiece scale adapted to the microscope. The scale was placed perpendicularly in relation to the inner boundary of each of the areas in which measurements were carried out. The average thickness of each region was calculated and the results were used in the data analysis.

Statistical Analysis

Values are expressed as mean \pm SD and multiple comparisons between the different groups were made using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$ for all tests.

Results

Hippocampal Volume

Figure 1 shows mean hippocampal volume, considering the following factors: undernourishment, seizures and enriched environment. Hippocampus volumetry was not influenced by undernourishment ($p=0.349$) or seizures ($p=0.596$). However, exposure to the enriched environment, resulted in an increase in the hippocampal volume of rats from nourished ($p<0.001$), nourished + recurrent seizure ($p<0.001$) and undernourished + recurrent seizure ($p=0.003$) groups.

Hippocampal CA1 subfield thickness

The thickness of the hippocampal CA1 subfield was not affected by undernourishment ($p=0.771$) and recurrent seizures ($p=0.895$). However, as shown in Figure 2, enriched environment increased the CA1 subfield thickness in the nourished ($p=0.004$) and in the undernourished ($p=0.005$) groups. In semithin sections, note the increased thickness after enriched stimulation in the CA1 subfield (Figure 3).

Neuronal density in the hippocampus CA1 and CA3 subfield

We observed a significantly decreased neuronal density in the CA1 subfield of rats undernourished ($p=0.010$) when compared with nourished group (Figure 4A). Animals submitted to undernourishment + recurrent seizures ($p=0.046$) showed a lower neuronal density when compared with nourished group. The average neuronal density in CA3 subfield of rats in the undernourished group ($p=0.002$) was lower than in the nourished group (Figure 4B). In semithin sections, note the reduced hippocampal CA3 pyramidal cells in undernourished animals (Figure 5). When undernourished rats were exposed to enrich stimulation showed slightly higher neuronal density in CA3 subfield when compared with undernourished rats in the nonenriched.

Glial density in the hippocampus CA1 and CA3 subfield

The average glial density in the CA1 and CA3 subfield was basically the same when compared between nourished and undernourished animals submitted to recurrent seizures and enriched environment (Figure 4 C,D).

Discussion

We report here that undernourishment during early development is associated with decreased neuronal density in the CA1 and CA3 subfield, as well as a decrease in the glial density in CA1 subfield. In parallel, recurrent seizures promoted a decrease in the glial density in CA1 and CA3 subfield. Furthermore, we found that animals submitted to the enriched environment showed an increased hippocampal volume and thickness of CA1 layer. These findings suggest that an increased environmental complexity might induce morphologic changes in the brain.

Many investigators found biochemical alterations in the CNS in experimental malnutrition and seizures models in a developing brain in the hippocampal CA1 and CA3 subfield as well as the dentate gyrus [19,29,36,37,40,41], related to malfunctions in neurotransmitter systems, such as the glutamatergic system [42,43], decreasing the number of synapses [44] and dendritic spines [45]. All of these changes in the developing brain may promote a decrease in the neuronal and glial density in CA1 and CA3 subfield in recurrent seizure and undernourishment. Bayer [46] showed that undernourished animals exhibited a reduction in density of the hippocampus, as well as a decrease in volumetric layer of cells.

Likewise, Andrade and colleagues [47] have shown that all hippocampal population of neurons is affected by undernutrition. In a previous work, seizures reduce the number of neurons in the CA3 region, however this reduction was not found in CA1 [29]. The specific vulnerability of the hippocampus to the undernourishment was emphasized by lower neuronal density in the CA1 and CA3 subfield between the groups. Morphologic features of the hippocampal changes included specific deformations in particular the CA1 and CA3 subfield of the hippocampus. These microstructural data emphasize the relationship between morphologic hippocampal changes in epilepsy and undernourishment. These data allow us to suggest that undernourishment and recurrent seizure during development has long-term adverse effects on some important cognitive functions [7,28], allowing us to infer that these changes can be reflected directly by changes in neuronal and glial density in the hippocampus.

Even after a period of nutritional rehabilitation, rats undernourished early in life may show structural changes in hippocampus relevant to adulthood and these changes may hamper the adaptation of animals to the environment in adult life. Andrade and colleagues [47] showed that nutritional rehabilitation can neither reverse the deleterious effect of the morphological changes induced by undernourishment nor prevent neuronal degeneration. There is also no evidence of macroscopic brain atrophy in the brains of undernourished rats and it is conceivable that the hypothesis that decreased brain weight occurs due to neuronal loss, can be mitigated by regeneration mechanisms exhibited by surviving neurons [48,49], as well as an increased number of glial cells and an enlargement of its processes mediated by neuronal degeneration [50]. The reduction of neuronal and glial densities associated with comparatively normal volume of the hippocampus suggests that epilepsy and undernourishment results constitute an endorsement of the hypothesis that these factors affect brain development during neonatal period. Accordingly, it is possible that deleterious effects of undernourishment in neurons are indirect, possibly mediated by effects in glial cells. Sustained impaired brain function could be the consequence of transient disturbances of critical developmental steps by several yet to be discovered factors including early undernourishment and epilepsy [7]. We may speculate that the low glial density may be associated with an early reduction of astrocytic arborization and shrinkage of the astroglial domain, which may affect synaptic connectivity within the epilepsy and undernourishment, although this requires further investigation using immunohistochemical staining techniques to further characterize glial cells in different steps during the development.

Enriched environment has been shown to improve learning and memory ability [22,28,51]. It is possible that enriched environment can affect the expression of genes that

determine neuronal structure in the cerebral cortex and hippocampus [25]. These alterations could be both physiological or morphological, as well as changes in the neurotransmitter systems efficacy [26], neurogenesis and gliogenesis [27,52], increase in neurotrophic factors synthesis [53], dendritic arborization [54], synaptic density and neuronal plasticity [23,55]. A remarkable improvement was previously observed in the rat's learning and memory ability [28], and this improvement is correlated with structural changes in hippocampus related to volume and thickness of layer CA1. Our findings significantly advance the current understanding of the effects of enriched environment on undernourishment and recurrent seizures. These observations support the view that enrich environment may change the structural and functional modification of existing hippocampus formation. Observed increase in dendritic spines [56], myelinated fibers [57], enlargement of synaptic boutons and dentritic branching complexity [58] may underlie many of the morphological changes observed in the brains of the animals exposed to an enriched environment.

These abnormalities early in the hippocampus could represent the morphological basis of more durable and profound disturbances of neuronal circuitry and functioning, which would persist in adult animals. The malnutrition paradigm used in this study could receive criticisms due to the possible stress suffered by pup animals separated from their dams. We have addressed this question in a previous study where the effects of extra uterine malnutrition and intrauterine malnutrition in hippocampal cell counting were analyzed. When compared to controls we have found a decrease in the number of neurons in all regions (CA1, CA2, CA3, CA4) except DG for both paradigms. However, intra-uterine malnutrition model interestingly changed the hippocampal neuronal number without changing the body and brain weight, as well as the seizure threshold [29].

In summary, our work indicates that rodent brain remain highly plastic and responsive to complex experiences in adulthood. Behavioral problems, school failure and memory impairment are common among children with epilepsy and undernourishment and are the central focus of concern for many families [59]. Therapeutic efficacy demonstrated by environmental enrichment in our study calls for educational intervention and cognitive rehabilitation early in life to allow compensation for academic vulnerability experienced by children exposed to epilepsy and undernourishment.

Acknowledgments

This work was supported by research grants PNPB 2010 from Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)- Brazil.

Disclosure

Authors have no conflict of interest to declare

References

1. Hoffmann AF, Zhao Q, Holmes GL. Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the "two-hit hypothesis". *Epilepsy Behav* 2004; **5**: 873-7.
2. Huang LT, Lai MC, Wang CL et al. Long-term effects of early-life malnutrition and status epilepticus: assessment by spatial navigation and CREB(Serine-133) phosphorylation. *Brain Res Dev Brain Res* 2003; **145**: 213-8.
3. Levitsky DA, Strupp BJ. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J Nutr* 1995; **125**: 2212S-20S.
4. Andrade JP, Castanheira-Vale AJ, Paz-Dias PG, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. The dendritic trees of neurons from the hippocampal formation of protein-deprived adult rats. A quantitative Golgi study. *Exp Brain Res* 1996; **109**: 419-33.
5. Bedi KS. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 1991; **311**: 425-33.
6. Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav R* 2002; **26**: 471–483.
7. Hemb M, Cammarota M, Nunes ML. Effects of early malnutrition, isolation and seizures on memory and spatial learning in the developing rat. *Int J Dev Neurosci* 2010; **28**: 303-7.
8. Tonkiss J, Galler JR, Morgane PJ, Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ. Prenatal protein malnutrition and postnatal brain function. *Ann N Y Acad Sci* 1993; **678**: 215-27.
9. Fukuda MT, Françolin-Silva AL, Almeida SS. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. *Behav Brain Res* 2002; **133**: 271-7.
10. Gramsbergen A, Westerga J. Locomotor development in undernourished rats. *Behav Brain Res* 1992; **48**: 57-64.
11. Cowan LD. The epidemiology of the epilepsies in children. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; **8**: 171–181.
12. Bergman I, Painter MI, Hirsch RP, Crumrine PK, David R. Outcome of neonates with convulsions treated in an intensive care unit. *Ann Neurol* 1983; **14**: 642–647.

13. Lynch M, Sayin U, Bownds J, Janumpalli S, and Sutula T. Long-term consequences of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity. *Eur J Neurosci* 2000; **12**: 2252-64.
14. Majak K and Pitkanen A. Do seizures cause irreversible cognitive damage? Evidence from animal studies. *Epilepsy Behav* 2004; **5**: S35–S44.
15. Sayin U, Sutula TP, Stafstrom CE. Seizures in the developing brain cause adverse long-term effects on spatial learning and anxiety. *Epilepsia* 2004; **45**: 1539-48.
16. Stafstrom CE. Assessing the behavioral and cognitive effects of seizures on the developing brain. *Prog Brain Res* 2002; **135**: 377-90.
17. Wasterlain CG. Effects of neonatal status epilepticus on rat brain development. *Neurology* 1976; **26**: 975–986.
18. Holmes GL, Sarkisian M, Ben-Ari Y, Chevassus-Au-Louis N. Mossy fiber sprouting following recurrent seizures during early development in rats. *J Comp Neurol* 1999; **404**: 537–553.
19. Liu Z, Yang Y, Silveira DC, et al. Consequences of recurrent seizures during early brain development. *Neuroscience* 1999; **92**: 1443–1454.
20. Nishimura M, Owens J, Swann JW. Effects of chronic network hyperexcitability on the growth of hippocampal dendrites. *Neurobiol Dis* 2008; **29**: 267–277.
21. Swann JW, Le JT, Lee CL. Recurrent seizures and the molecular maturation of hippocampal and neocortical glutamatergic synapses. *Dev Neurosci* 2007; **29**: 168–178.
22. Faverjon S, Silveira DC, Fu DD, Cha BH, Akman C, Hu Y, Holmes GL. Beneficial effects of enriched environment following status epilepticus in immature rats. *Neurology* 2002; **59**: 1356-64.
23. Pinaud R, Penner MR, Robertson HA, Currie RW. Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment: implications for molecular plasticity. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; **91**: 50-6.
24. Krech D, Rosenzweig MR, Bennett EL. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. *J Comp Physiol Psychol* 1960; **53**: 509-19.
25. Rampon C, Jiang CH, Dong H, et al. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 12880-884.
26. Rosenzweig MR, Bennett EL. Cerebral changes in rats exposed individually to an enriched environment. *J Comp Physiol Psychol* 1972; **80**: 304-13.
27. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 2000; **1**: 191-8.
28. Simão F, Porto JA, Nunes ML. Effects of enriched environment in spatial learning and memory of immature rats submitted to early undernourish and seizures. *Int J Dev Neurosci* 2012; **30**: 363-7.
29. Florian ML, Nunes ML. Effects of intra-uterine and early extra-uterine malnutrition on seizure threshold and hippocampal morphometry of pup rats. *Nutr Neurosci* 2011; **14**: 151-8.
30. Crnic LS. Models of infantile malnutrition in rats: effects on maternal behavior. *Dev Psychobiol* 1980; **13**:615.
31. Ladd CO, Owens MJ, Nemroff CB. Persistent changes in corticotrophin releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. *Endocrinology* 1996; **137**: 1212-1218.
32. Plotsky PM, and Meaney MJ. Early postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress induced release in adult rats. *Mol Brain Res* 1993; **18**: 195-200.
33. Nunes ML, Liptakova S, Veliskova J, Sperber EF, Moshe SL. Malnutrition increases dentate granule cell proliferation in immature rats after status epilepticus. *Epilepsia* 2000; **41**: S48-52.
34. Simão F, Matté A, Matté C, et al. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na(+)/K(+)-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. *J Nutr Biochem* 2011; **22**: 921-8.

35. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; **147**: 229–263.
36. García-Ruiz M, Díaz-Cintra S, Cintra L, Corkidi G. Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res* 1993; **625**: 203-12.
37. Cintra L, Aguilar A, Granados L, et al. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. *Hippocampus* 1997; **7**: 192-203.
38. Abreu-Villaça Y, Silva WC, Manhães AC, Schmidt SL. The effect of corpus callosum agenesis on neocortical thickness and neuronal density of BALB/cCF mice. *Brain Res Bull* 2002; **58**: 411-416.
39. Hedreen JC. Unbiased stereology? *Trends Neurosci* 1999; **22**: 346-7.
40. Ben-Ari Y, Holmes GL. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol* 2006; **5**: 1055-1063.
41. Lukoyanov NV, Andrade JP. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behav Brain Res* 2000; **112**: 85-97.
42. Marks JD, Friedman JE, Haddad GG. Vulnerability of CA1 neurons to glutamate is developmentally regulated. *Brain Res Dev Brain Res* 1996; **97**: 194-206.
43. Millan MH, Chapman AG, Meldrum BS. Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Res* 1993; **14**: 139-48.
44. Warren MA, Bedi KS. A quantitative assessment of the development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats. *J Comp Neurol* 1984; **227**: 104-8.
45. Leuba G, Rabinowicz T. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. II. Evolution of dendritic branchings and spines in the visual region. *Exp Brain Res* 1979; **37**: 299-308.
46. Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol* 1980; **190**: 115-34.
47. Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Effects of long-term malnutrition and rehabilitation on the hippocampal formation of the adult rat. A morphometric study. *J Anat* 1995; **187**: 379-93.
48. Coleman PD, Flood DG. Dendritic proliferation in the aging brain as a compensatory repair mechanism. *Prog Brain Res* 1986; **70**: 227-37.
49. Diaz-Cintra S, Garcia-Ruiz M, Corkidi G, Cintra L. Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res* 1994; **662**: 117-26.
50. Yu MC, Lee JC, Bakay L. The ultrastructure of the rat central nervous system in chronic undernutrition. *Acta Neuropathol* 1974; **30**: 197-210.
51. Wilson R, Barnes L, Bennett D. Assessment of lifetime participation in cognitively stimulation activities. *J Clin Exp Neuropsychol* 2003; **25**: 634-642.
52. Kempermann G, Gage FH. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus* 1999; **9**: 321-32.
53. Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 1999; **5**: 448-53.
54. Ip EY, Giza CC, Griesbach GS, Hovda DA. Effects of enriched environment and fluid percussion injury on dendritic arborization within the cerebral cortex of the developing rat. *J Neurotraum* 2002; **19**: 573-85.
55. Nakamura H, Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S. Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. *J Neurosci Res* 1999; **56**: 307-15.

56. Globus A, Rosenzweig MR, Bennett EL, Diamond MC. Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J Comp Physiol Psychol* 1973; **82**: 175-181.
57. Qiu X, Huang CX, Lu W, et al. Effects of a 4 month enriched environment on the hippocampus and the myelinated fibers in the hippocampus of middle-aged rats. *Brain Res* 2002; **1465**: 26-33.
58. Greenough WT, Volkmar FR, Juraska JM. Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Exp Neurol* 1973; **41**: 371-378.
59. Austin JK, Dunn DW, Caffrey HM, Perkins SM, Harezlak J, Rose DF. Recurrent seizures and behavior problems in children with first recognized seizures: a prospective study. *Epilepsia* 2002; **43**: 1564-1573.

Legends

Figure 1. Effects of enrich environment on the hippocampal volumetry by the end of the period of enrich stimulation (P51). Data are presented as the mean \pm SD, n= 6 per group. N, nourished; N+EE, nourished + enriched environmental; N+RS, nourished + recurrent seizures; N+EE+RS, nourished + enriched environmental + recurrent seizures; U, undernourished; U+EE, undernourished + enriched environmental; U+RS, undernourished + recurrent seizures; U+RS+EE, undernourished + recurrent seizures + enriched environmental. * $p < 0.001$ vs. N group, ** $p < 0.001$ vs. N+RS, *** $p = 0.003$ vs. U.

Figure 2. Effects of enrich environment on hippocampal CA1 subfield thicknesses by the end of the period of enrich stimulation (P51). Data are presented as the mean \pm SD, n= 6 per group. N, nourished; N+EE, nourished + enriched environmental; N+RS, nourished + recurrent seizures; N+EE+RS, nourished + enriched environmental + recurrent seizures; U, undernourished; U+EE, undernourished + enriched environmental; U+RS, undernourished + recurrent seizures; U+RS+EE, undernourished + recurrent seizures + enriched environmental. * $p = 0.004$ vs. N group, ** $p = 0.005$ vs. U+RS.

Figure 3. Light micrographs of brain tissue from the pyramidal stratum of CA1 subfield of a nourished (A) and an enriched environment nourished (B) rat. Note the increased thickness after enrich stimulation in the CA1 subfield (B). All specimens were photographed at 400X.

Figure 4. Changes in neuronal and glial densities in CA1 and CA3 hippocampus subfields. Individual values of neuronal density measured in sublayers CA1 (A) and CA3 (B) are presented. Individual values of glial density measured in sublayers CA1 (C) and CA3 (D) are presented. Note decreases in values in all sublayers in undernourished animals as compared to control nourished. Data are presented as the mean \pm SD, n= 6 per group. N, nourished; N+EE, nourished + enriched environmental; N+RS, nourished + recurrent seizures; N+EE+RS, nourished + enriched environmental + recurrent seizures; U, undernourished; U+EE, undernourished + enriched environmental; U+RS, undernourished + recurrent seizures; U+RS+EE, undernourished + recurrent seizures + enriched environmental. * p=0.004 vs. N group, ** p=0.005 vs. U+RS.

Figure 5. Light micrographs of brain tissue from the CA3 pyramidal layer of a nourished (A) and an undernourished (B) rat. Note the reduced packing density after undernourishment (B). All specimens were photographed at 400X.

Figure 1

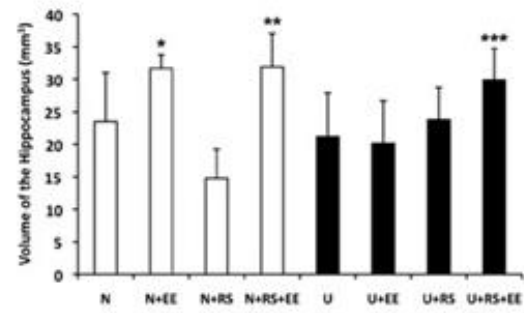


Figure 2

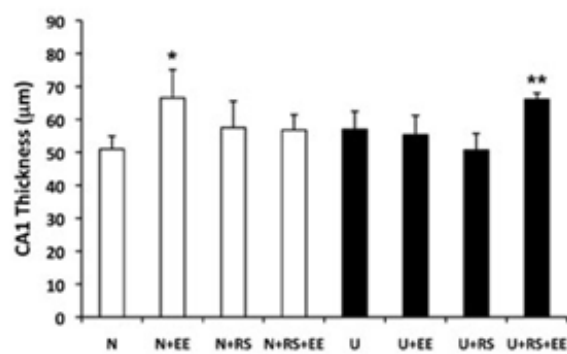


Figure 3

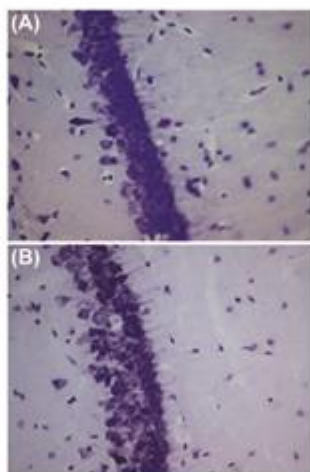


Figure 4

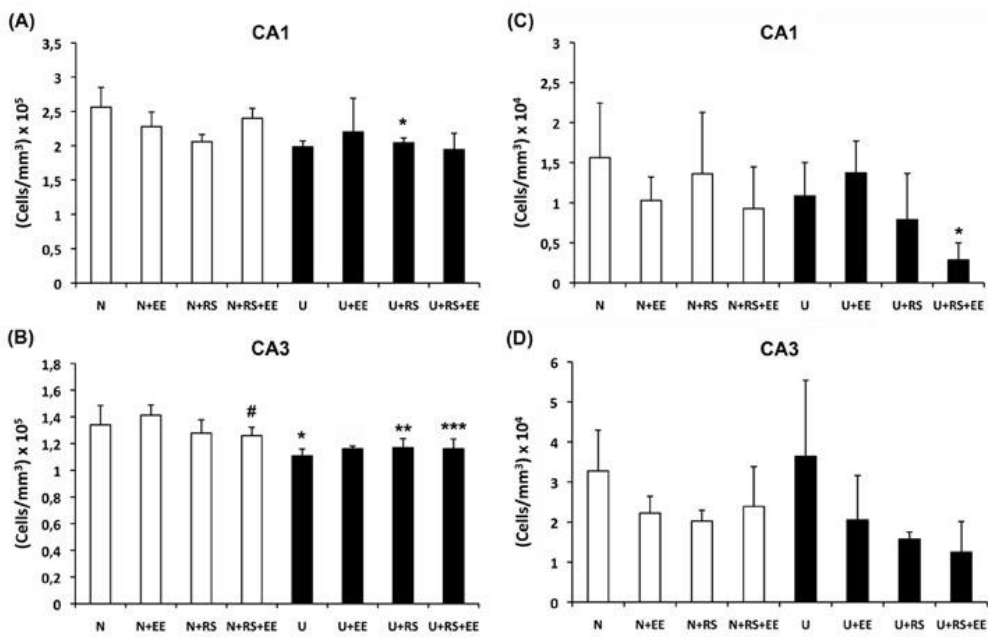


Figure 5