

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS**

**MARIANA LORENZET FLORIAN**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO INTRA-UTERINA E EXTRA-  
UTERINA PRECOCE NO LIMAR DE CRISES CONVULSIVAS E NA  
MORFOMETRIA DO HIPOCAMPO**

**PORTO ALEGRE, 2010**

**Mariana Lorenzet Florian**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO INTRA-UTERINA E EXTRA-  
UTERINA PRECOCE NO LIMIAR DE CRISES CONVULSIVAS E NA  
MORFOMETRIA DO HIPOCAMPO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Magda Lahorgue Nunes**

**Porto Alegre, 2010.**

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F635a Florian, Mariana Lorenzet

Avaliação dos efeitos da desnutrição intra-uterina e extra-uterina precoce no limiar de crises convulsivas e na morfometria do hipocampo / Mariana Lorenzet Florian. – Porto Alegre, 2010.

83 f.: il. gráf. tab.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Magda Lahorgue Nunes.

1. DESNUTRIÇÃO. 2. CONVULSÕES. 3. HIPOCAMPO. 4. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. 5. ANIMAIS DE LABORATÓRIO. 6. RATOS. I. Nunes, Magda Lahorgue. II.

Título.

CDD 616.8  
NLM WL 140

**Ficha Catalográfica elaborada por  
Nívea Bezerra Vasconcelos e Silva CRB 10/1255**

*“Aos meus queridos pais, que nunca deixaram de me apoiar”.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à minha orientadora, Dra. Magda Lahorgue Nunes, pela orientação, incentivo e também pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao professor Dr. Vinicius Duval da Silva, pelos conhecimentos passados, de vital importância. Ao técnico do laboratório de patologia do hospital São Lucas, Tiago Giuliani Lopes, pela paciência, carinho e indispensável ajuda.

Ao pessoal do Neurolab, que sempre me deu uma força quando eu precisava. Ao Samuel Greggio, Gianina Venturin, Mariana Santos, Yanet Alles e Tatiane Camozzato, pelos ensinamentos e carinho. À minha querida colega Juliana Porto, por me inserir nesta linha de pesquisa e sempre estar tirando minhas dúvidas. Às risadas e a sempre presente ajuda e conselhos da Suzete Pires. À Simone Salomoni e Daniela Abreu, por cuidarem tão bem do laboratório e pelos amparos prestados. Ao Ricardo Breda, pelas ajudas técnicas e pelo sempre bom-humor. Às meninas da iniciação científica, pelas “ajudinhas” e companheirismo. Às novas mestrandas Elisa Kaminsky e Caroline Calice, pela amizade; e em especial à Bibiana França, pelo companheirismo, carinho e ajuda.

Aos funcionários do IPB, Priscila Salvato e Daniel Marinowic, pelo apoio e ensinamentos.

Ao Cristiano Köhler e Weber Cláudio da Silva, do Centro de Memória, pelo também apoio e conhecimento.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, pela atenção prestada.

Ao meu namorado, Daniel Bohn, pela ajuda, paciência e por acreditar em mim. Aos meus amigos, pelo incentivo.

E finalmente à minha família, por todo amor, dedicação, suporte e motivação.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>13</b>
1.1 DESNUTRIÇÃO INFANTIL.....	13
1.2 EPILEPSIA E CRISES CONVULSIVAS.....	15
1.3 DESNUTRIÇÃO PERINATAL, EPILEPSIA E HIPOCAMPO.....	18
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 ESQUEMA DOS EXPERIMENTOS .....	23
3.2 PARADIGMA DA DESNUTRIÇÃO INTRA-UTERINA .....	24
3.3 PARADIGMA DA DESNUTRIÇÃO EXTRA-UTERINA.....	24
3.4 MODELO DE CRISES CONVULSIVAS.....	24
3.5 HISTOLOGIA .....	25
3.6 MORFOMETRIA.....	26
3.6.1 CÁLCULO DO VOLUME.....	26
3.6.2 CÁLCULO DA DENSIDADE CELULAR.....	27

3.6.3 ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS.....	28
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 PESO CORPORAL.....	30
4.2 PESO CEREBRAL.....	31
4.3 LIMIAR PARA CRISE .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
4.4 NÚMERO DE NEURÔNIOS POR REGIÃO DO HIPOCAMPO.....	32
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>54</b>

**LISTA DE ABREVIACOES**

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**BPN** Baixo peso ao nascer

**NMDA** N-methyl-D-aspartaton

**AMPA** Alpha amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazole proprionic acid

**GABA** Gama-aminobutyric acid

**KCC2** Cotransportador de cloreto

**NKCCI** Cotransportador de acúmulo de Cl

**CA1** Corno de Amon 1

**CA2** Corno de Amon 2

**CA3** Corno de Amon 3

**CA4** Corno de Amon 4

**EEG** Eletroencefalograma

**SNC** Sistema nervoso central

**GD** Giro denteado

**DICC** Desnutrição intra-uterina com crise

**DISC** Desnutrição intra-uterina sem crise



**DECC** Desnutrição extra-uterina com crise

**DESC** Desnutrição extra-uterina sem crise

**NCC** Nutrição adequada com crise

**NSC** Nutrição adequada sem crise

**HPA** Hipotálamo-pituitária-adrenal

**SHRP** Stress hyporesponsive period

**ACTH** Hormônio adrenocorticotrófico

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

**Tabela 1:** Comparação de idade entre ratos e humanos.

**Tabela 2:** Comparação do peso cerebral entre os grupos. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos marcados.

**Tabela 3:** Comparação do limiar para crise nos grupos com crise. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa em relação aos outros dois grupos.

**Tabela 4:** Comparação do número de células em cada região do hipocampo. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos marcados (\*CA2, \*\*CA3, \*\*\*GD).

**Gráfico 1:** Peso corporal diário de P0 a P15 dos animais dos seis grupos em estudo. Grupos: Desnutrição intra-uterina com crise (DICC), Desnutrição extra-uterina com crise (DECC), Nutrição adequada com crise (NCC), Desnutrição intra-uterina sem crise (DISC), Desnutrição extra-uterina sem crise (DESC) e Nutrido controle sem crise (NSC). Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos marcados com os grupos NCC, NSC e DISC.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Câmara e bomba de infusão do flurotil.

**Figura 2:** Porção anterior do hipocampo dorsal de um rato (aumento de 4X) dividido nas regiões delineadas: CA1 (rosa), CA2 (verde), CA3 (vermelho), CA4 (azul) e GD (amarelo).

**Figura 3:** A - região CA3 de um rato do grupo DISC. B - região CA3 de um rato do grupo NCC, com maior número de neurônios.

**Figura 4:** A - região CA2 de um rato do grupo NCC. B - região CA2 de um rato do grupo DISC, com menor número de neurônios.

**Figura 5:** A - giro denteado de um rato do grupo NSC. B - giro denteado de um rato do grupo NCC, mostrando a diferença visível na quantidade celular.

**Figura 6:** Regiões CA1 de dois ratos de grupos diferentes, mostrando que a quantidade de neurônios é similar.

**Figura 7:** Regiões CA4 de dois ratos de grupos diferentes, mostrando que a quantidade de neurônios é similar.

## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar a influência de dois paradigmas distintos de desnutrição (intra-uterina x extra-uterina) no peso corporal e cerebral, no limiar para crises convulsivas e na morfometria do hipocampo de ratos em desenvolvimento.

**Metodologia:** O modelo de desnutrição intra-uterina constou em reduzir pela metade a ração oferecida à fêmea durante todo o período gestacional; a desnutrição extra-uterina constou da limitação progressiva da lactação através do afastamento da fêmea nutriz de seus filhotes, de P2 a P15. A indução de crise convulsiva foi realizada através da exposição ao flurotil, em P15. No mesmo dia, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca e seus cérebros foram processados histologicamente. A análise morfométrica baseou-se na estimativa do número total de neurônios das regiões CA1, CA2, CA3, CA4 e giro denteado do hipocampo, através do cálculo do volume e da densidade celular.

**Resultados:** A desnutrição extra-uterina reduziu de forma significativa o peso corporal dos animais, tanto em P7 como em P15; e cerebral, somente no grupo sem crise, em relação aos controles nutridos. O limiar para crise convulsiva também foi significativamente reduzido nos animais desnutridos extra-uterinos em relação aos nutridos e desnutridos intra-uterinos. A desnutrição intra-uterina *per se* reduziu significativamente o número de células das regiões CA2 e CA3 do hipocampo, em relação aos animais nutridos. Não encontramos diferença significativa entre os dois tipos de desnutrição em relação ao número de células nas cinco regiões hipocâmpais. No giro denteado encontramos um aumento significativo ( $p=0,03$ ) de células no grupo nutrido submetido à crise convulsiva, em relação ao nutrido sem crise.

**Conclusões:** O paradigma de desnutrição extra-uterina foi mais eficaz que o intra-uterino na redução no peso corporal e cerebral dos animais em estudo, assim como na redução do limiar para crises convulsivas. A morfometria do hipocampo não evidenciou diferença significativa quando comparados os paradigmas de desnutrição entre si. Entretanto, a desnutrição intra-uterina trouxe redução celular em CA2 e CA3 em comparação aos controles nutridos. Os animais nutridos submetidos à crise convulsiva apresentaram maior celularidade no giro denteado.

# 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 Desnutrição Infantil

A desnutrição infantil, apesar da redução mundial da sua prevalência, é atualmente o problema de saúde pública mais importante dos países em desenvolvimento. Mais de 50% das mortes de crianças menores de cinco anos que ocorrem nestes países é influenciada pela desnutrição. (Monte, 2000).

A OMS (Organização Mundial de Saúde) estima que mais de 20 milhões de crianças nasçam com baixo peso a cada ano, cerca de 150 milhões de crianças menores de cinco anos tenham baixo peso para a sua idade e 182 milhões (32,5%) tenha baixa estatura. Alguns autores referem, no entanto, que esses valores podem estar subestimados devido a dificuldades para o cálculo de cifras exatas sobre a prevalência mundial de desnutrição (Monte, 2000).

As conseqüências da desnutrição precoce parecem permanecer para toda a vida: a alteração do comportamento e da cognição, alteração do crescimento somático e alterações metabólicas (obesidade, hipercolesterolemia e diabetes) (Bohrer, 2007). Além disso, o sistema nervoso central em desenvolvimento corre o risco de sofrer alterações graves, fisiológicas e morfológicas (Huang *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2004), como distúrbios anatômicos, bioquímicos e comportamentais (Akman *et al.*, 2004).

Em modelos animais, além de retardar o crescimento cerebral, a desnutrição pode também diminuir o dendrito apical e reduzir o número de espinhas dendríticas (Benitez-Bribiesca *et al.*, 1999).

Entre os fatores que contribuem para a desnutrição na criança pequena encontram-se as suas necessidades relativamente maiores, tanto de energia como de proteínas, em relação aos demais membros da família; o baixo conteúdo energético dos alimentos complementares utilizados e administrados com freqüência insuficiente; a disponibilidade inadequada de alimentos devido à pobreza,

desigualdade social, falta de terra para cultivar e problemas de distribuição intra-familiar; as infecções virais, bacterianas e parasitárias repetidas, que podem produzir anorexia e reduzir a ingestão de nutrientes, sua absorção e utilização, ou produzir a sua perda; as fomes causadas por secas ou outros desastres naturais ou guerras; as práticas inadequadas de cuidado infantil tais como administração de alimentos muito diluídos e/ou não higienicamente preparados (Monte, 2000).

Além disso, hoje se sabe que o feto sofre as conseqüências de carências alimentares da gestante durante a gravidez, e também, muito provavelmente, de déficits nutricionais presentes no período pré-concepcional (Siqueira *et al.*, 1975a).

A desnutrição materna, como foi visto por Siqueira e col., prejudica o crescimento do feto, tanto em peso como em altura, e aumenta o risco de mortalidade e morbidade perinatais (Siqueira *et al.*, 1975b).

A deficiência nutricional durante a gravidez está fortemente ligada ao baixo peso de nascimento e à prematuridade. Segundo Rodriguez e colaboradores, a incidência de BPN - baixo peso ao nascer entre filhos de parturientes desnutridas foi 23,6%, valor significativamente diferente ( $p < 0,005$ ) do encontrado entre filhos de mulheres não desnutridas no final da gestação - 10,8%. Comparando mulheres que iniciaram o processo gravídico desnutridas e que não se recuperaram com aquelas que se recuperaram, verifica-se risco relativo 2,8 vezes maior de conceptos com BPN entre as primeiras (Rodriguez *et al.*, 1991).

O papel do estado nutricional materno em relação ao crescimento e desenvolvimento do feto vem sendo muito discutido através do tempo e as opiniões a respeito sofreram uma grande mudança. O conceito do parasitismo fetal, em que, sem levar em conta qualquer déficit materno, o feto retira e utiliza os nutrientes de que necessita, não é mais aceito. Há muitas evidências, atualmente, de que carências nutricionais maternas podem provocar não só o crescimento intra-uterino deficiente, como a diminuição da população celular nos diferentes setores da economia fetal, especialmente no que diz respeito ao sistema nervoso central (Siqueira *et al.*, 1975a).

Desde 1965, um grande número de pesquisas têm se voltado para a questão de como a desnutrição precoce pode afetar o desenvolvimento do cérebro e até que ponto limitar a capacidade intelectual dos afetados.

Em várias pesquisas experimentais, utilizando-se de ratos (Dobbing, 1964; Winick & Noble, 1966; Chase *et al.*, 1967; Culley & Lineberger, 1968; Smart *et al.*, 1973), camundongos (Randt & Derby, 1973), porquinhos-da-índia (Chase *et al.*, 1971) e porcos (Dickerson & Dobbing, 1966), observou-se que a desnutrição precoce não só reduziu o crescimento cerebral, mas também, o deixou permanentemente menor.

O período de maior crescimento cerebral em mamíferos é o período de maior vulnerabilidade à desnutrição. Em ratos (modelo experimental mais utilizado de desnutrição), este período se dá na fase pós-natal (Dobbing, 1964; Dickerson & Dobbing, 1966). Assim, as estruturas como o cerebelo e hipocampo, que se desenvolvem nesta fase, estão mais suscetíveis a alterações permanentes devido à desnutrição. Porém, segundo Morgane e colaboradores, o período de maior vulnerabilidade seria o pré-natal, quando a organização de neurônios específicos durante a ontogênese ocorre (Morgane *et al.*, 1993).

Em vários estudos, o córtex cerebral, região mais relacionada com a função intelectual e cognitiva, apresentou uma redução de volume (West & Kemper, 1976; Leuba & Rabinowicz, 1979b; Bedi & Bhide, 1988) e tamanho (Dobbing & Sands, 1971; Clark *et al.*, 1973; West & Kemper, 1976) após desnutrição precoce. Contudo, o número de neurônios corticais parece não ter sido afetado, apenas o número de células da glia cortical, com significativa redução (Leuba & Rabinowicz, 1979a).

## **1.2 Epilepsia e Crises Convulsivas**

A epilepsia, segundo a Liga Brasileira de Epilepsia, é uma desordem cerebral, na qual ocorre uma alteração temporária e reversível do funcionamento do cérebro, desde que não tenha sido causada por febre, drogas ou distúrbios metabólicos. Durante alguns segundos ou minutos, uma parte do cérebro emite sinais anormais,

que podem ficar restritos a esse local ou espalhar-se. Se ficarem restritos, a crise será chamada parcial; se envolverem os dois hemisférios cerebrais, generalizada. Por isso, algumas pessoas podem ter sintomas não tão evidentes de epilepsia, não significando que o problema tenha menos importância se a crise for menos aparente (Liga Brasileira de Epilepsia).

As crises epiléticas são caracterizadas por uma atividade elétrica anormal e excessiva de grupos neurais. As crises convulsivas são crises epiléticas associadas com manifestações motoras.

No mundo, a incidência de epilepsia varia de 30 a 50 pessoas por 1000 habitantes por ano, e sua prevalência é de cinco a nove pessoas por 1000 habitantes (Logroscino *et al.*, 2001).

No Brasil essa prevalência sobe para 12 pessoas por 1000 habitantes (Guerreiro *et al.*, 2000) e em Porto Alegre sobe para 16,5 pessoas por 1000 (Fernandes, 1993).

Segundo um estudo americano, a incidência de epilepsia em crianças e adolescentes parece ser significativa entre todas as populações estudadas, com valor de 50 a 100 casos por 100.000 jovens. A maior incidência verificada foi no primeiro ano de vida (Hauser, 1994).

As crises convulsivas constituem a mais freqüente das manifestações neurológicas no período neonatal (Nunes *et al.*, 1994; Volpe, 1995; Lombroso *et al.*, 1998), porém cabe lembrar que nem toda crise convulsiva é sinônimo de epilepsia. Em estudo avaliando uma coorte de recém nascidos com crises convulsivas, foi observada a incidência de epilepsia após o período neonatal em 30% dos casos (Silva *et al.*, 2004).

A incidência das convulsões neonatais varia entre cinco e 15 por 1000 nascidos vivos nas estatísticas européias e americanas. Em nosso meio não há dados, porém é de se esperar que seja maior, devido às condições nem sempre



satisfatórias do atendimento pré e perinatal e ao maior número de infecções adquiridas no período neonatal (Gherpelli & Lefèvre, 1981).

Esta grande propensão de recém-nascidos virem a desenvolver eventos ictais pode ser explicada pela descoberta da expressão idade-dependente de vários receptores para neurotransmissores excitatórios, sendo o glutamato o principal deles, subtipos N-methyl-D-aspartato (NMDA) e alpha amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazole proprionic acid (AMPA), com o pico entre sete e 14 dias pós-natais, além dos receptores para Kainato, com um pico posterior (Tremblay *et al.*, 1988; Insel *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1990).

Outro achado interessante sobre a freqüência de crises em neonatos envolve o sistema gabaérgico. Enquanto, no cérebro, adulto a ativação de receptores GABA (gama-aminobutyric acid) gera uma hiperpolarização, em neurônios imaturos, geralmente ocorre despolarização (Ben-Ari, 2002; Staley, 2006). Neurônios corticais neonatais contêm altos níveis de íons Cl<sup>-</sup> porque o cotransportador de cloreto KCC2, responsável pela retirada do cloro intracelular é pouco desenvolvido (Owens *et al.*, 1996). No período neonatal e na infância, o cotransportador NKCC1 – cotransportador de acúmulo de Cl<sup>-</sup>, é o de maior atividade. Contudo, a atividade excitatória gabaérgica também já foi descrita no córtex adulto (Gulledge & Stuart, 2003).

Outro aspecto estudado é acerca da glia, sabido que ela desenvolve um papel regulatório sobre o glutamato extracelular. A imaturidade dos astrócitos no período neonatal os torna incapazes de controlar a excessiva concentração de potássio e glutamato extracelular, o que contribui para uma maior excitabilidade neural (Chesnut & Swann, 1988; Dzhala & Staley, 2003).

Foi demonstrado que crises prolongadas no cérebro em desenvolvimento aumentam o risco de crises convulsivas subseqüentes e epilepsia (Nunes *et al.*, 2000). Isso pode ser explicado pelo fato do período neonatal ser a fase de maior susceptibilidade ao desenvolvimento de convulsões (Aicardi, 1998).

O cérebro imaturo é mais resistente aos danos causados pelas crises convulsivas do que o cérebro adulto, porém, crises convulsivas prolongadas que acontecem precocemente podem provocar injúrias celulares e hiperexcitabilidade em resposta às crises depois, na vida adulta (Wasterlain *et al.*, 1990). Richter sugere a existência de agentes compensatórios inatos, que agiriam contra as comorbidades que afetam o cérebro em desenvolvimento. Segundo ele, estes agentes falhariam provavelmente nas patologias mais severas (Richter, 1965).

### **1.3 Desnutrição Perinatal, Epilepsia e Hipocampo**

O hipocampo já foi descrito como "aquela belíssima estrutura encefálica à procura de uma função" e muitas das funções neurais já foram relacionadas a ele. Contudo, hoje, se sabe que ele está relacionado principalmente com a memória e o aprendizado (Joca *et al.*, 2003).

Um grande número de evidências sugere que a memória, declarativa ou explícita, depende de um hipocampo adequadamente funcionante (Liu *et al.*, 2003). Crises convulsivas, especialmente decorrentes da Epilepsia do Lobo Temporal, podem gerar danos no hipocampo e amígdala (Da Silva & Cavalheiro, 2004).

Estudos neuroanatômicos, há muito tempo, trazem evidências de que o hipocampo é afetado pela desnutrição precoce. Segundo Cintra e colaboradores, o tamanho das células granulares do giro denteado e a quantidade de ramificações dendríticas mostraram-se reduzidos (Diaz-Cintra *et al.*, 1990), assim como o número de células granulares, permanecendo assim mesmo após reabilitação nutricional (Bedi, 1991; 1991b). Outros estudos também revelam uma diminuição das células piramidais do hipocampo, após desnutrição. Jordan e col. demonstraram uma redução permanente no número de células das regiões CA (Corno de Amon) 1, CA2, CA3, CA4 e giro denteado (Jordan *et al.*, 1982).

A relação entre a desnutrição e as crises convulsivas ainda não está totalmente elucidada. Há estudos que sugerem que as crianças desnutridas possam estar mais propensas a crises convulsivas do que as bem nutridas (Nunes *et al.*,

1999). Existem, ainda, vários estudos com animais que sugerem uma diminuição nos limiares para crise convulsiva em modelos de epilepsia ou crise convulsiva (Stern *et al.*, 1974; Bronzino *et al.*, 1986; Sharma *et al.*, 1990; Sharma *et al.*, 1990b; Gietzen *et al.*, 1996; Nunes *et al.*, 2000). Além disso, a desnutrição afeta a maturação dos padrões de EEG (eletroencefalograma) em ratos, e a eficácia sináptica (Morgane *et al.*, 1985).

A desnutrição também pode influenciar as conseqüências de crises convulsivas, resultando em lesão exagerada em resposta às crises e em efeitos prejudiciais para toda a vida.

Em seres humanos, o período de maior vulnerabilidade do SNC ocorre desde o segundo trimestre de gestação até o segundo ano de vida (Dobbing & Sands, 1971). Em roedores, esta fase compreende desde o nascimento até a terceira semana de vida, quando ocorre o desenvolvimento do hipocampo e cerebelo (Morgane *et al.*, 1993).

As células do giro denteado se formam entre os dias 17 a 22 do período embrionário (Bayer, 1980). Apenas 20% das células granulares hipocampais estão presentes no rato ao nascer, e em P5 mais ou menos 50% está presente. Sabe-se que a neurogênese do GD (giro denteado) continua até o período adulto, porém com uma taxa cada vez menor ao longo do tempo; 80% das células granulares do GD são formadas no período pós-natal (Altman & Das, 1965).

Foi demonstrado que a desnutrição precoce influencia a neurogênese no hipocampo imaturo de forma positiva; e que, quando a desnutrição é associada ao estado epiléptico, ocorre aumento desta plasticidade neuronal nas células granulosas do giro denteado (hipocampo) de ratos imaturos (Nunes *et al.*, 2000). No entanto, vários estudos revelam que a desnutrição precoce faz diminuir o número de células hipocampais ou a neurogênese (Jordan *et al.*, 1982; Bedi, 1991; 1991b; Akman *et al.*, 2004).

Debassio e colaboradores verificaram que a desnutrição pré-natal gerou resultados contraditórios quanto à neurogênese pós-natal em três períodos

diferentes: os ratos injetados com timidina em P8 (dia pós-natal) tinham um número menor de células marcadas, em P15 não houve diferença e em P30 o número de células marcadas era significativamente maior. Em um estudo anterior a este, o mesmo autor mostra que há um decréscimo no número de células nos ratos injetados no dia 20 de gestação (E20) e submetidos à desnutrição intra-uterina, porém, nenhum efeito nos grupos injetados em E12 e E16, também desnutridos; além disso, mostrou que não houve diferença entre nutridos e desnutridos na formação das células piramidais (Debassio *et al.*, 1994).

Estudos recentes também apontam uma relação do hipocampo com a resposta ao estresse. A exposição a estressores significantes - podendo ser neste caso uma crise epiléptica, induz remodelamento dendrítico em células piramidais hipocampais e diminuição da neurogênese no giro denteado do hipocampo de animais de laboratório, incluindo primatas (Joca *et al.*, 2003).

Considerando a existência de um número substancial de crianças com desnutrição e epilepsia, além do aumento significativo da sobrevivência de neonatos prematuros com muito baixo peso de nascimento, é importante conhecer os efeitos das convulsões no cérebro em desenvolvimento de um indivíduo desnutrido, assim como a interação desnutrição – hipocampo, essencial para o sistema cognitivo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral:

Verificar a relação causal consistente entre dois métodos de desnutrição intra – uterina e extra- uterina precoce e o limiar para crise convulsiva e alterações morfométricas do hipocampo em ratos em desenvolvimento.

### 2.2 Específicos:

- Comparar a eficácia dos diferentes tipos de desnutrição em relação ao peso corporal e peso cerebral de ratos em desenvolvimento.
- Comparar o efeito dos diferentes tipos de desnutrição na morfometria do hipocampo.
- Comparar o efeito dos diferentes tipos de desnutrição no limiar para crises convulsivas realizadas em P15.
- Verificar os possíveis efeitos do estresse causado pela separação da fêmea nutriz no paradigma de desnutrição extra-uterina na morfometria do hipocampo.

### 3 METODOLOGIA

Estudo experimental, controlado, desenvolvido no Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (IPB-PUCRS).

Foram utilizadas 12 fêmeas Wistar prenhes e suas ninhadas, das quais 45 filhotes machos serviram para o experimento. Os animais foram tratados conforme o protocolo de normas e cuidados para animais de laboratório (Lopes, 1992) e foram mantidos, durante todo período experimental, no IPB da PUCRS, alojados em sistema de gaiolas individualizadas e climatizadas (*one cage system*). Todos tiveram livre acesso à ração e água (exceto quando o protocolo de desnutrição materna foi aplicado) e foram mantidos em sistema claro/escuro de 12 horas. A idade dos filhotes foi calculada em dias de vida após o nascimento, sendo P0 considerado o dia do nascimento e os dias subseqüentes como P1 à P15.

As ninhadas foram alocadas aleatoriamente em seis grupos divididos em dois experimentos (três grupos para cada experimento). Ambos os experimentos tiveram em torno de seis a nove ratos por grupo.

O primeiro experimento constou em avaliar a influência do tipo de desnutrição no limiar para crises convulsivas e com a morfometria do hipocampo, ambos em P15.

O segundo experimento teve como objetivo analisar a relação do tipo de desnutrição com a morfometria do hipocampo também em P15.

Os animais do grupo 1 de ambos experimentos foram submetidos ao paradigma de desnutrição intra-uterina ou materna, isto é, a fêmea nutriz passou por processo de desnutrição durante a gestação. Os animais do grupo 2 de cada experimento foram submetidos ao paradigma de desnutrição extra-uterina de P2 a P15. Neste paradigma os filhotes são separados da fêmea nutriz por período crescente de tempo. Os animais do grupo 3 de cada experimento tiveram livre

acesso à fêmea nutriz desde o nascimento e serviram como controle . Todos os ratos foram pesados diariamente.

### 3.1 Esquema dos experimentos:

Experimento 1:

Grupo 1 (G1) - Desnutrição intra-uterina + crise convulsiva + morfometria do hipocampo (7 ratos)

Grupo 2 (G2) - Desnutrição extra-uterina + crise convulsiva + morfometria do hipocampo (6 ratos)

Grupo 3 (G3) - Nutrição adequada + crise convulsiva + morfometria do hipocampo (9 ratos)

Experimento 2:

G1 - Desnutrição intra-uterina + morfometria do hipocampo (7 ratos)

G2 - Desnutrição extra-uterina + morfometria do hipocampo (8 ratos)

G3 - Nutrição adequada + morfometria do hipocampo (8 ratos)

**Tabela 1:** Comparação de idade entre ratos e humanos.

Ratos	Humanos
<7 dias	prematureo
7dias	9 meses
12 dias	recém-nascido
15 dias	3-4 anos
18 dias	6-8 anos
20 dias	12 anos
30 dias	13-14 anos
60 dias	adulto

### **3.2 Paradigma da desnutrição intra-uterina:**

As fêmeas submetidas a este paradigma tiveram uma redução de 50 % da ração recebida. O período de desnutrição iniciou desde a confirmação da prenhez até o nascimento dos filhotes (Gurmini *et al.*, 2005).

### **3.3 Paradigma da desnutrição extra-uterina:**

O regime de desnutrição utilizado constou da limitação progressiva da lactação através do afastamento da fêmea nutriz aos seus filhotes. O afastamento iniciou em P2, com duas horas de duração, e foi progressivamente aumentado de duas horas por dia até o máximo de 12 horas/dia (P7 a P15). O período de desnutrição foi mantido por 15 dias. Durante a separação, os filhotes foram mantidos juntos em gaiola aquecida, de forma que suas temperaturas corporais se mantiveram em torno de 34° C. Os animais controle permaneceram sempre com a nutriz com livre acesso à lactação (Nunes *et al.*, 2000).

### **3.4 Modelo de crises convulsivas:**

O Flurotil [bis-(2,2,2-trifluorethyl)éter] é um agente volátil e potente, bloqueador do receptor GABA A, que estimula rapidamente o SNC, induzindo crises convulsivas generalizadas em poucos minutos. O Flurotil foi sempre utilizado em câmara vedada, posicionada dentro da capela do laboratório. Adaptada à câmara, utilizamos uma bomba de infusão para controle do gotejamento (Nunes *et al.*, 2000).

O modelo para indução de crises convulsivas que foi utilizado (em P15) constou em manter os animais na câmara fechada e expostos ao Flurotil, com 4-6 gotas por minuto, até que ocorresse a primeira crise tônico-clônica generalizada (Boukhezra *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.* 2004). Em seguida, os filhotes se recuperaram em gaiola aquecida e em ar ambiente, retornando ao restante da ninhada após as crises clínicas terem cessado completamente.





**Figura 1:** Câmara e bomba de infusão do fluoroil.

### 3.5 Histologia

Em P15, os animais selecionados foram anestesiados com Xilasina 2% e Ketamina 5% e receberam perfusão transcardíaca com solução salina e paraformaldeído a 4%.

Após a excisão cirúrgica dos encéfalos, o material foi pesado e colocado em material fixador – paraformaldeído a 4% durante um período de 24 a 48 horas. Depois, foi lavado em água corrente durante 20 minutos. As peças foram colocadas no processador de graduação alcoólica de 70 a 100% e testadas com xilol, durante o período de 12 horas. Logo após a retirada do material do processador, o mesmo foi emblocado em parafina para posterior fatiamento e coloração.

Os cérebros foram seccionados coronalmente em micrótomo com espessura de 5 micra ( $\mu$ ). Os cortes foram distribuídos com intervalo de dois cortes aproveitados (um deles foi analisado) para dez eliminados, conforme o método de Cavalieri (Gundersen & Jensen, 1987). As lâminas foram coradas pelo método de Cresyl-violeta, também conhecido como Nissl.

O hipocampo, bem como, as suas subdivisões foram identificados de acordo com o atlas para cérebro de ratos de Paxinos e Watson (Paxinos & Watson, 1998).

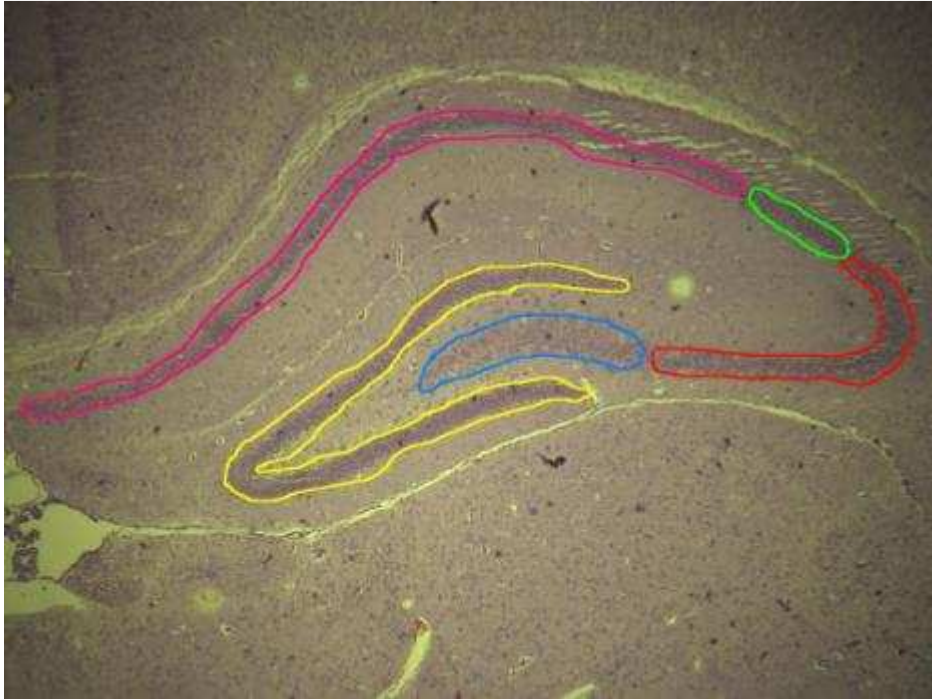
### **3.6 Morfometria**

O estudo morfométrico foi realizado com microscópio equipado com lentes de 4, 10, 40 e 100 aumentos (Olympus BX40).

#### **3.6.1 Cálculo do volume**

Para a contagem do volume, as áreas de interesse foram selecionadas após baixa amplificação (4x) nas áreas hipocampais CA1, CA2, CA3, CA4 e giro denteado, segundo a divisão de Lorente de Nó (Lorente De Nó, 1934). As imagens foram digitalizadas em abertura fixa (4x) pela câmera CCDQi capture no software Image Pro Plus 6.0. As bordas de cada região hipocampal foram traçadas com o uso do mouse do computador.

A estimativa de volume foi obtida através da média de todas as áreas (correspondentes a cada secção) de um cérebro multiplicada pela distância entre as secções, representada por  $V = \Sigma A.T$  e apresentado em  $\text{mm}^2$  ( $V =$  Volume;  $\Sigma A =$  somatório das áreas;  $T =$  distância entre as secções) (Gundersen & Jensen, 1987).



**Figura 2:** Porção anterior do Hipocampo dorsal de um rato (aumento de 4X) dividido nas regiões delineadas: CA1 (rosa), CA2 (verde), CA3 (vermelho), CA4 (azul) e GD (amarelo).

### 3.6.2 Cálculo da densidade celular

A contagem celular neuronal foi realizada através do sistema quantitativo bi-dimensional, por teste de pontos criado pelo software Image Pro Plus 6.0 (Capture Media Cybernetics, USA) (Gundersen *et al.*, 1998).

A coloração de Nissl marca primordialmente os corpúsculos de Nissl ou substância tigróide, constituídos por retículo endoplásmico rugoso responsável por síntese protéica, presentes no citoplasma neural; assim, o corpo celular neural foi considerado a representação de um neurônio. A  $Q_A$  (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 excluídas da contagem por seu tamanho relativamente menor e falta de marcação citoplasmática (Schmitz & Hof, 2005).

Em cada região hipocampal analisada, foram feitas médias a partir de quatro campos contados (40x), a fim de equilibrar a diferença de densidade celular existente de um campo para outro. A contagem foi feita nos hipocampos direito ou esquerdo aleatoriamente, em uma área teste de  $91582 \mu\text{m}^2$ .

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 pode ser contado, no entanto, quando cortar as linhas aceitáveis ou estiver dentro da área completamente, ele deve ser contado (Howard & Reed, 1998).

A densidade numérica de neurônios ( $N_v$ ) pôde ser estimada pela seguinte fórmula:  $N_v = Q_A/A_T \cdot e$  ( $1/\text{mm}^2$ ); onde  $N_v$ = densidade numérica de neurônios;  $Q_A$ = número dos neurônios contados na área teste;  $A_T$ = área teste;  $e$ = espessura (Mandarin-De-Lacerda, 1995; Mandarin-De-Lacerda, 2003).

### **3.6.3 Estimativa do número total de células**

A partir dos dados obtidos na avaliação da densidade numérica ( $N_v$ ) de células e do cálculo do volume, aplica-se outra fórmula e, facilmente, obtem-se dados referentes à estimativa do número total de neurônios:  $N = V \cdot N_v$ ; onde  $N$ =

número total de células; V= estimativa de volume; Nv= densidade numérica (West & Gundersen, 1990).

### **3.7 Análise Estatística**

As seguintes variáveis foram comparadas entre os grupos através da análise de variância - ANOVA, seguido do teste de Dunnett e teste de Duncan, com nível de significância  $\alpha=0,05$ , no pacote estatístico SPSS 11.5:

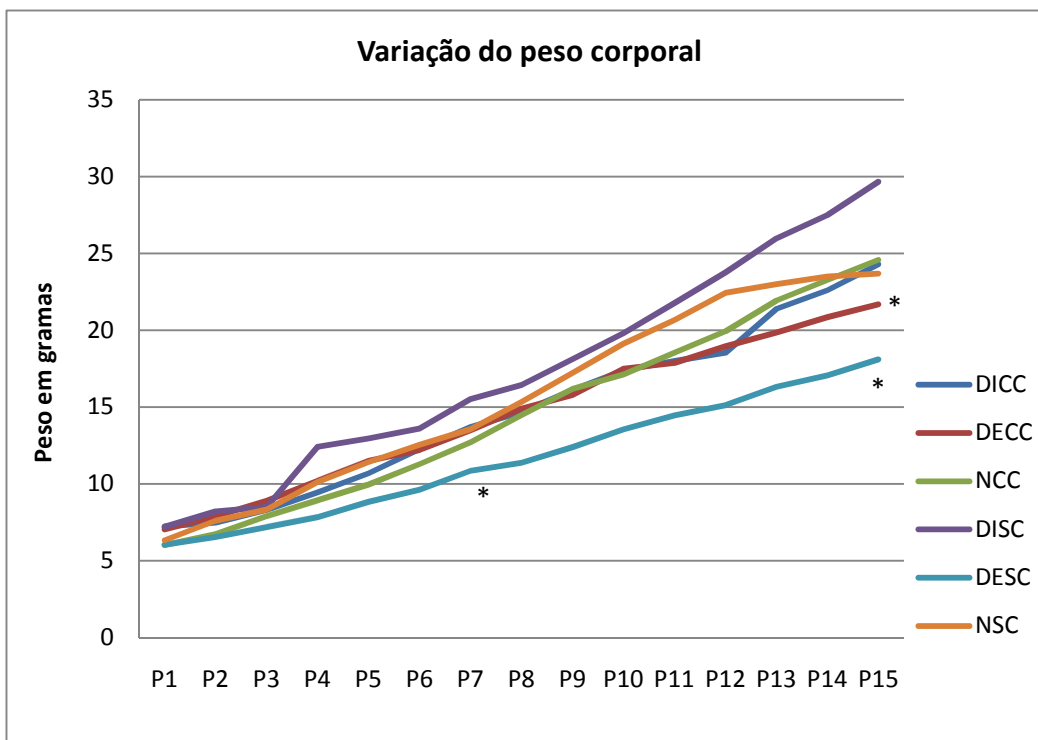
- Limiar para crises convulsivas
- Estimativa do número total de neurônios das regiões CA1, CA2, CA3, CA4 e giro denteado do hipocampo
- Pesagem corporal dos ratos
- Pesagem dos cérebros após perfusão

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Peso corporal

Foi observada variação de peso corporal entre os animais dos diferentes grupos durante o seguimento de P1 a P15.

Em P7, evidencia-se diferença significativa de peso entre os animais submetidos ao protocolo de desnutrição extra-uterina (grupo DESC) com os grupos NCC ( $p=0,03$ ), NSC ( $p=0,004$ ) e DISC ( $p=0,01$ ). Em P15, ambos os grupos com desnutrição extra-uterina apresentaram peso significativamente inferior, em relação aos mesmos de P7. O grupo DECC obteve uma significância de  $p=0,007$  com o NCC, de  $p=0,0001$  com o NSC e de  $p=0,02$  com o DISC. O grupo DESC teve  $p=0,0001$  em relação aos mesmos três grupos (gráfico 1).



**Gráfico 1:** Peso corporal diário de P0 a P15 dos animais dos seis grupos em estudo. Grupos: Desnutrição intra-uterina com crise (DICC), Desnutrição extra-uterina com crise (DECC), Nutrição adequada com crise (NCC). Desnutrição intra-uterina sem crise (DISC), Desnutrição extra-uterina

sem crise (DESC) e Nutrido controle sem crise (NSC). Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos marcados com os grupos NCC, NSC e DISC.

A comparação entre o peso de nascimento dos animais submetidos ao paradigma de desnutrição intra-uterina e o controle não foi significativa (respectivamente  $6.76 \text{ gramas} \pm 0,687$  e  $6.20 \pm 0,388$ ;  $p < 0,05$ ).

#### 4.2 Peso Cerebral

Em relação ao peso cerebral, verificado em P15, foi observada diferença significativa entre os grupos NCC e DESC ( $p=0,01$ ) (tabela 2).

**Tabela 2:** Comparação do peso cerebral entre os grupos. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos marcados.

Grupo	Peso cerebral em gramas		
	Peso máximo	Peso mínimo	Peso médio $\pm$ desvio padrão
DICC	1,2	1,0	$1,0 \pm 0,106$
DECC	1,3	1,1	$1,1 \pm 0,104$
NCC	1,3	1,1	$1,2 \pm 0,078^*$
DISC	1,3	1,1	$1,1 \pm 0,075$
DESC	1,2	0,9	$1,0 \pm 0,091^*$
NSC	1,3	1,0	$1,1 \pm 0,106$
Total	1,3	0,9	$1,1 \pm 0,107$

### 4.3 Limiar para crise

O grupo DECC apresentou o menor limiar para crise, sendo observada diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos DICC ( $p=0,01$ ) e NCC ( $p=0,0001$ ) (tabela 3).

**Tabela 3:** Comparação do limiar para crise entre os grupos com crise. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa em relação aos outros dois grupos.

<b>Grupo</b>	<b>Limiar em minutos (média <math>\pm</math> dp)</b>
DICC	5,795 $\pm$ 1,827
DECC	2,916 $\pm$ 0,499*
NCC	6,170 $\pm$ 0,918
Total	5,170 $\pm$ 1,832

### 4.4 Número de neurônios por região do hipocampo

Nas regiões CA1 e CA4, não encontramos diferença significativa no número total estimado de neurônios entre os grupos para todas as regiões do hipocampo analisadas. Na região CA2, o grupo DISC demonstrou ter um número significativo menor de neurônios do que os grupos nutridos (NCC com  $p=0,001$  e NSC com  $p=0,002$ ). Em CA3, evidenciamos diferença significativa entre o grupo NCC e o DISC, sendo este último com um reduzido número celular ( $p=0,04$ ). No giro denteado (GD), o grupo NCC apresentou um número significativo maior do que o NSC ( $p=0,03$ ). Não foram evidenciadas diferenças entre os grupos (com e sem crise) submetidos aos paradigmas de desnutrição intra-uterina em relação aos grupos submetidos à desnutrição extra-uterina (tabela 4).

**Tabela 4:** Comparação do número de células em cada região do hipocampo. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos marcados (\*CA2, \*\*CA3, \*\*\*GD).

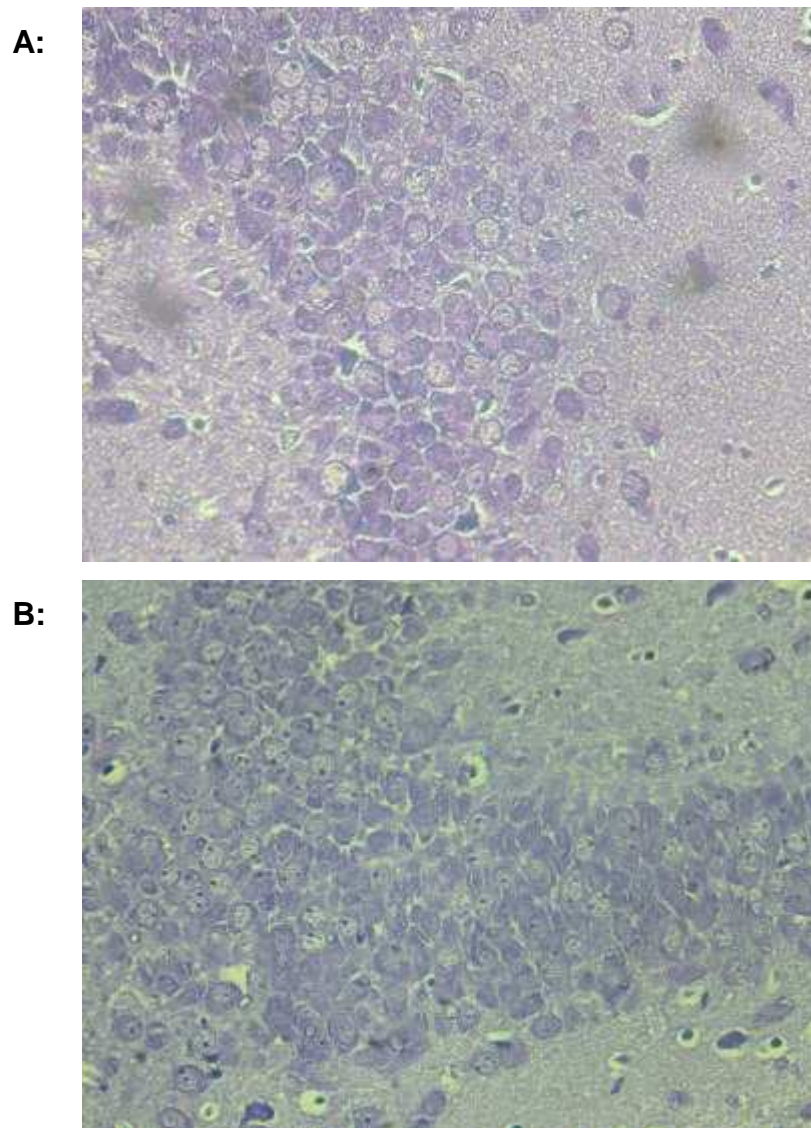


<b>Grupo</b>		<b>CA1</b>	<b>CA2</b>	<b>CA3</b>	<b>CA4</b>	<b>GD</b>
<b>DICC</b>	<b>Máx</b>	255771	4101	20070	3773	32621
	<b>Mín</b>	19562	755	9402	1882	23962
	<b>Média</b>	12650	2358	14610	2677	29322
	<b>Dp</b>	3962,3	1151,5	4003,5	726,9	3142,2
<b>DECC</b>	<b>Máx</b>	28174	5888	21628	7624	36808
	<b>Mín</b>	13081	2039	9644	3099	15854
	<b>Média</b>	19320	3472	14040	5394	26487
	<b>Dp</b>	6158,7	1569,1	4325,0	1616,9	7545,2
<b>NCC</b>	<b>Máx</b>	30062	5130	31288	6536	45547
	<b>Mín</b>	16020	2531	13940	1957	25196
	<b>Média</b>	22328	3682*	22267**	4120	34717***
	<b>Dp</b>	5633,9	939,4	5916,0	1246,0	7571,9
<b>DISC</b>	<b>Máx</b>	22782	3011	16671	3418	31123
	<b>Mín</b>	10249	874	7286	1229	20034
	<b>Média</b>	14615	1370*	13858**	2591	24802
	<b>Dp</b>	3996,9	737,9	3228,4	795,7	3908,7
<b>DESC</b>	<b>Máx</b>	31060	7703	35762	4597	44569
	<b>Mín</b>	11371	1325	3198	1597	22245
	<b>Média</b>	20265	3930	17574	2806	32462
	<b>Dp</b>	6093,1	2467,7	8370,4	1019,9	7137,7
<b>NSC</b>	<b>Máx</b>	23160	4856	25553	7572	29978
	<b>Mín</b>	16295	2214	7934	2694	19221
	<b>Média</b>	19491	3594*	14558	4755	23951***
	<b>Dp</b>	2311,8	895,7	6791,3	1510,4	4027,0
<b>Total</b>	<b>Máx</b>	31060	7703	35762	7624	45547

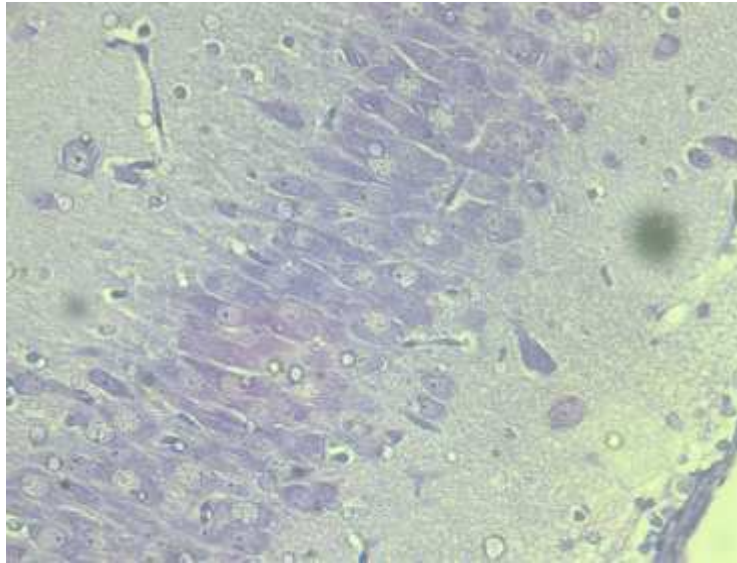
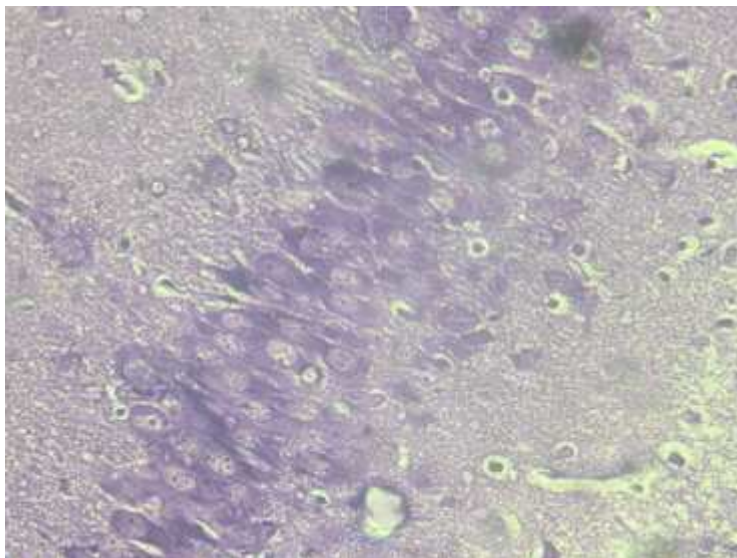
<b>Mín</b>	10249	755	7286	1229	15854
<b>Média</b>	19426	3117	16466	3707	28923
<b>Dp</b>	6941,4	5166,6	1616,5	6386,0	1550,2

Abaixo, podemos ver algumas imagens, capturadas em aumento de 40X, revelando a diferença encontrada no número neuronal nas regiões CA3, CA2 e giro denteado; além das regiões CA1 e CA4, que não evidenciaram uma diferença significativa.

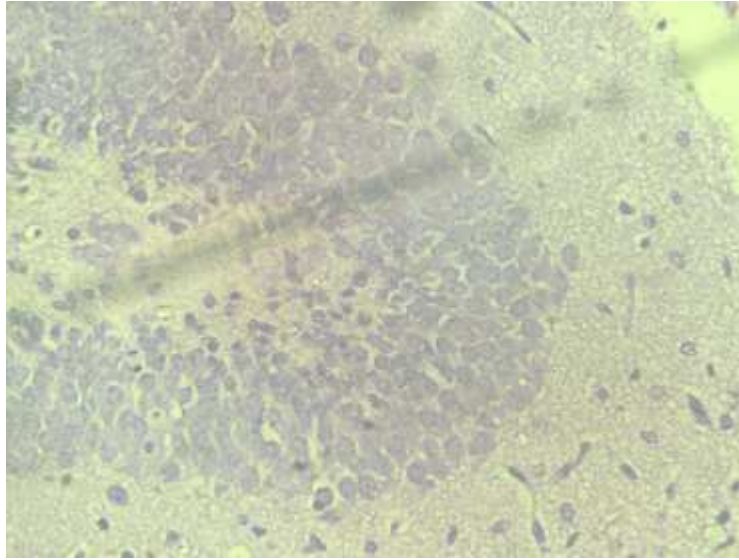
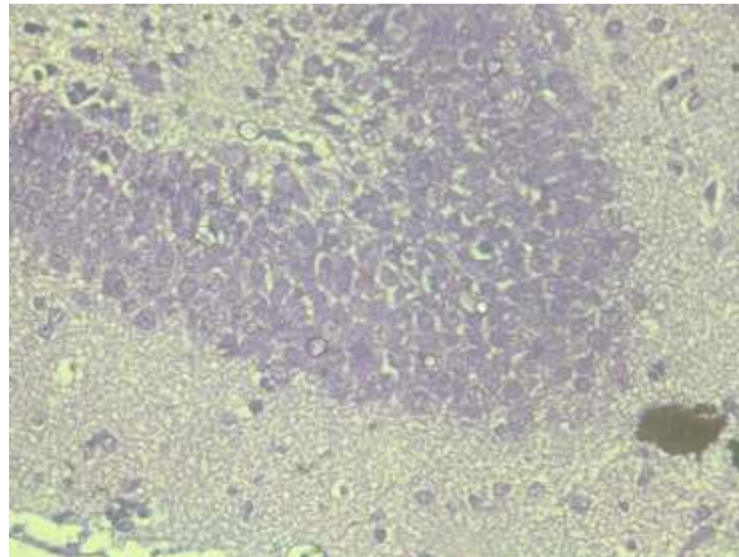
**Figura 3**



**Figura 3:** A- região CA3 de um rato do grupo DISC. B - região CA3 de um rato do grupo NCC, com maior número de neurônios.

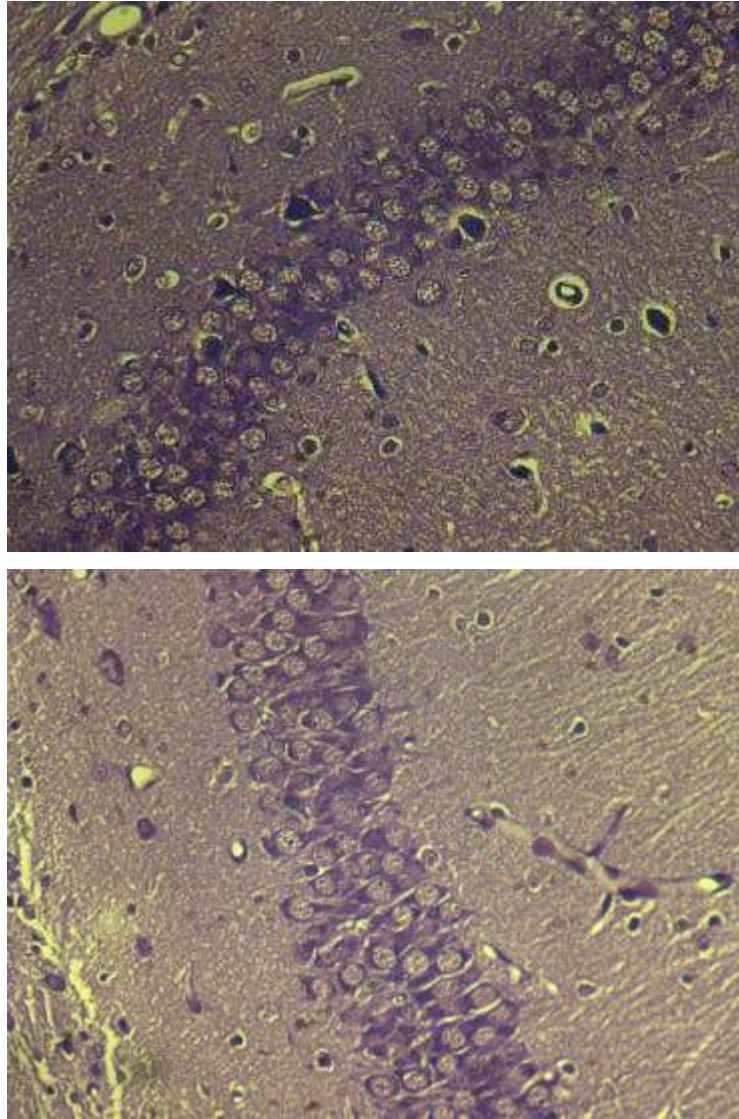
**Figura 4****A:****B:**

**Figura 4:** A - região CA2 de um rato do grupo NCC. B - região CA2 de um rato do grupo DISC, com menor número de neurônios.

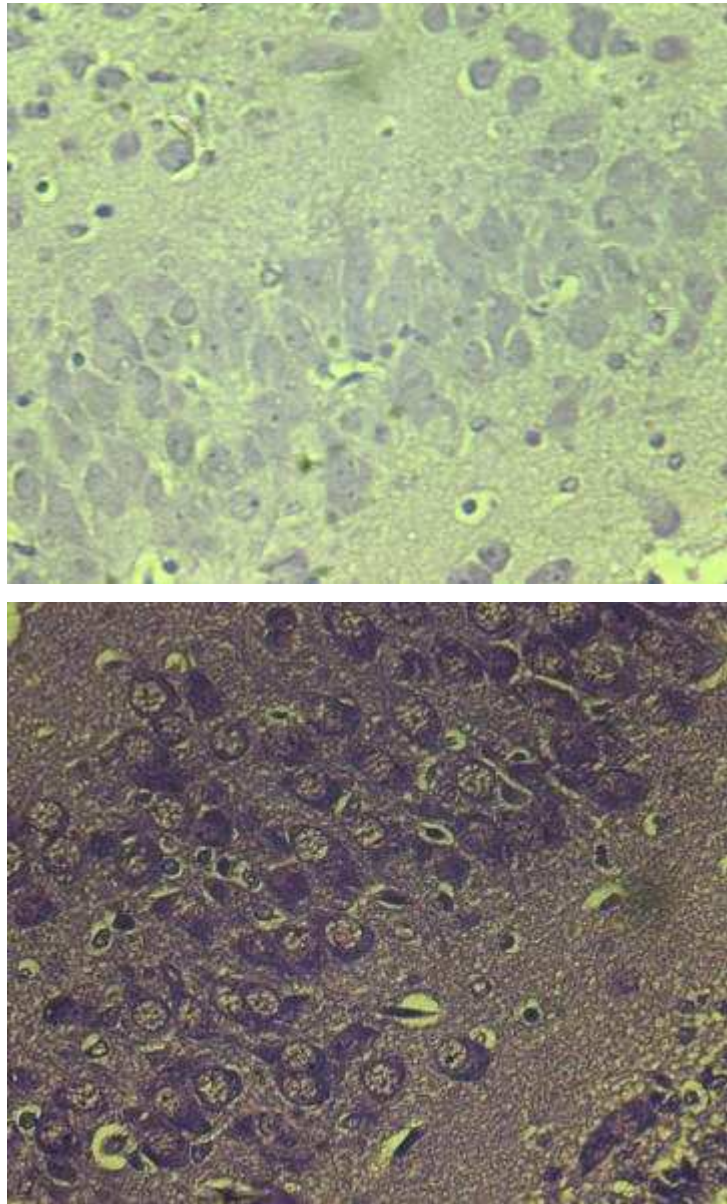
**Figura 5****A:****B:**

**Figura 5:** A - giro denteado de um rato do grupo NSC. B - giro denteado de um rato do grupo NCC, mostrando a diferença visível na quantidade celular.



**Figura 6**

**Figura 6:** Regiões CA1 de dois ratos de grupos diferentes, mostrando que a quantidade de neurônios é similar.

**Figura 7**

**Figura 7:** Regiões CA4 de dois ratos de grupos diferentes, mostrando que a quantidade de neurônios é similar.

## 4 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como proposta avaliar a influência de dois paradigmas distintos de desnutrição no peso corporal e cerebral, no limiar para crises convulsivas e na morfometria do hipocampo de ratos em desenvolvimento. Nosso interesse era também o de verificar se os possíveis efeitos do estresse, causado pela separação da fêmea nutriz no paradigma de desnutrição extra-uterina, causariam *per se* modificações no hipocampo.

Em relação à efetividade do paradigma de desnutrição observa-se que o mais eficiente nesta amostra foi o extra-uterino. Esta efetividade já havia sido comprovada em estudos anteriores (Nunes *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2002).

É possível que o modelo de desnutrição intra-uterina utilizado não tenha sido tão eficaz pelo fato de não ser um modelo hipoprotéico, ou senão, por não termos iniciado a desnutrição antes da confirmação da prenhez, a fim de garantir uma desnutrição crônica, como evidenciado em outros estudos (Debassio *et al.*, 1996; Lister *et al.*, 2006).

Em relação ao peso cerebral, não foi observada diferença significativa entre os grupos, exceto pelos animais dos grupos NCC e DESC, sendo este último com menor peso cerebral. O fato do grupo DECC não apresentar um menor peso cerebral pode ser devido ao edema cerebral secundário à crise convulsiva (Seitelberger *et al.*, 1990; Fountain, 2000). Em relação aos grupos com desnutrição intra-uterina, como também não tiveram uma redução do peso corporal, já era esperado este resultado, pois sabe-se que o cérebro é protegido em detrimento de outras estruturas quando sob insulto nutricional (Hales & Barker, 1992).

Em relação ao limiar para crise convulsiva, houve influência do tipo de desnutrição, sendo que os animais do grupo extra-uterino apresentaram limiar significativamente inferior. Estudos prévios de nosso grupo, utilizando flurotil haviam observado previamente esta tendência, sem, contudo, observar resultados significativos (Nunes *et al.*, 2000). Estudos prévios com outros modelos de indução

de crise também observaram menor limiar em animais desnutridos (Stern *et al.*, 1974; Bronzino *et al.*, 1986; Sharma *et al.*, 1990; Sharma *et al.*, 1990b; Gietzen *et al.*, 1996).

A contagem celular nas diferentes regiões do hipocampo pôde ser avaliada em relação a dois fatores: presença x ausência de crise e desnutrição intra x extra-uterina.

Comparando os grupos semelhantes com e sem crise, encontrou-se um aumento significativo de neurônios no giro denteado do grupo NCC em relação ao NSC.

Sabe-se que tanto crises agudas como recorrentes estimulam a proliferação de células progenitoras no giro denteado em ratos adultos (Benzon *et al.*, 1997; Gray & Sundstrom, 1998; Scott *et al.*, 1998; Parent, 2002). Já, no cérebro imaturo, os resultados são controversos, alguns estudos mostram que o status epilepticus induz aumento de neurogênese (Nunes *et al.*, 2000; Sankar *et al.*, 2000; Porter *et al.*, 2004); porém, outros estudos revelam que crises recorrentes resultam numa menor neurogênese (McCabe *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003). Não encontramos pesquisas referentes à crise aguda na formação de novas células em ratos jovens. Outro fator a considerar, frente a este resultado, é o tempo necessário para a geração de novas células, pois os grupos submetidos à crise convulsiva foram sacrificados no mesmo dia da indução de crise, sendo assim, talvez não tenha havido tempo suficiente para observação de neurogênese (Gray & Sundstrom, 1998; Nakagawa *et al.*, 2000; Parent, 2002). Assim, podemos dizer que a diferença encontrada em relação ao número de células dos grupos NCC e NSC, não pode ser explicada pela neurogênese. Deve-se investigar melhor este achado através de novos estudos.

Comparando os dois paradigmas de desnutrição utilizados, não foi observada diferença significativa na contagem celular entre os grupos DISC e DESC em nenhuma região do hipocampo. Este achado é significativo no sentido de afastar a possibilidade de o 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 (Zhang *et al.*, 2002; King *et al.*, 2004; Mirescu *et al.*, 2004).

No estudo de Zhang e col., o número de células apoptóticas quase dobrou no córtex cerebral, córtex cerebelar e diversos tratos de substância branca, após vinte e quatro horas de separação materna, em P12 (Zhang *et al.*, 2002).

King e col., ao avaliar o efeito combinado da desnutrição protéica pré-natal e do estresse (separação materna, redução da temperatura corporal e imobilização) em ratos neonatais e jovens, não encontrou redução na neurogênese; porém, nos grupos que só foram expostos a um fator (desnutrição ou estresse), houve redução (na maior parte dos casos) ou aumento das células marcadas com bromodeoxiuridina. A modificação da gênese celular parece ser uma parte essencial da adaptação do rato ao meio exterior, e a desnutrição demonstrou alterar esta habilidade de resposta ao meio, no caso, ao estresse (King *et al.*, 2004).

Ratos adultos, separados da fêmea nutriz quando filhotes, apresentaram um decréscimo na proliferação celular e produção de neurônios imaturos no giro denteado, além de não mostrarem ativação do eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) e aumento de corticosterona em resposta ao estresse. Experiências adversas precoces parecem inibir a plasticidade estrutural por hipersensibilização aos glicocorticóides e diminuindo a capacidade do hipocampo de regular a neurogênese (Mirescu *et al.*, 2004).

Ratos jovens geralmente não respondem a pequenos fatores estressantes, entre P4 e P14, pois estão dentro do chamado período de hiporesponsividade ao estresse (SHRP, em inglês) (Schoenfeld *et al.*, 1980). Tem-se sugerido que este período serviria para proteger o cérebro em desenvolvimento dos altos níveis de glucocorticóides (Sapolsky & Meaney, 1986), os quais afetam a gênese das células granulares, tanto do hipocampo como do cerebelo, nas duas primeiras semanas pós-natais (Bohn, 1980; Bohn & Lauder, 1980). Contudo, com a separação materna eles secretam ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e corticosterona (Levine *et al.*, 1991). Quanto maior for o período de separação, maior será a responsividade ao estresse, chegando, ao máximo, em vinte e quatro horas (Suchecki *et al.*, 1993).

Em nosso estudo, tivemos o cuidado de manter contato (descrever) com os filhotes durante a separação maternal, além disso, eles foram mantidos em ambiente sem ruídos, com temperatura controlada e iluminação adequada; assim, podemos dizer que o estresse provocado foi, dentro do possível, reduzido. Suchecki e col. afirmam que o contato, *per se*, é suficiente para prevenir o aumento do ACTH provocado pela separação maternal (Suchecki *et al.*, 1993; Van Oers *et al.*, 1998).

Outro achado importante foi a influência da desnutrição intra-uterina *per se* na redução celular do hipocampo. Este achado foi previamente descrito na literatura (Debassio *et al.*, 1994; Debassio *et al.*, 1996; Lister *et al.*, 2005; Lister *et al.*, 2006) e poderia explicar, numa tentativa de extrapolação dos achados experimentais para a clínica, os déficits cognitivos e comportamentais observados em coortes de neonatos prematuros com muito baixo peso de nascimento (Do Espírito Santo *et al.*, 2009).

Sabe-se que períodos moderados a severos de desnutrição, antes dos dois primeiros anos de vida, podem estar associados a atraso no desenvolvimento cognitivo e no desempenho escolar em crianças (Hall *et al.*, 2001).

Existem, ainda, hipóteses de que a desnutrição intra-uterina esteja relacionada com manifestações que ocorreriam mais tardiamente na vida, como a esquizofrenia (Susser *et al.*, 1996; Weiss & Feldon, 2001). Análises *post-mortem* do cérebro de pacientes esquizofrênicos mostram evidências de migração neuronal anormal (Rioux *et al.*, 2003). Del Angel-Meza e colaboradores também mostram um retardo na migração de células granulares em córtex de cerebelo de ratos de 21 dias submetidos à desnutrição pré e pós-natal (Del Angel-Meza, *et al.*, 2001).

Um estudo de Jahnke e Bedi avaliou o grau de apoptose celular hipocampal após desnutrição desde a gestação até P21. Os animais desnutridos tiveram um aumento significativo de células apoptóticas no giro denteado, porém, nas regiões CA3-CA2, não houve diferença (Jahnke & Bedi, 2007). O menor número de neurônios visto no grupo DISC pode ser devido a um processo de apoptose celular, porém, nossos resultados diferem em relação à região em questão, já que este menor número de células foi encontrado justamente em CA2 e CA3.

As células piramidais do corno de Amon são geradas quase que totalmente antes do nascimento (Schlessinger *et al.*, 1978), o que pode determinar uma menor vulnerabilidade a elas. Vários estudos têm demonstrado que essas células são muito resistentes a insultos ambientais que ocorrem tanto no período pré-natal como no pós-natal (West, 1987; Bonthius & West, 1990; 1991; Debassio *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2002; Lister *et al.*, 2005); o que não condiz com nossos resultados, já que verificamos uma diminuição no número de células piramidais das regiões CA3 e CA2. Esta discrepância pode estar relacionada aos diferentes modelos de insultos - exposição ao álcool, desnutrição protéica, desnutrição de E1 até P21 e separação maternal de 24 horas; assim como pela diferença temporal em que os insultos foram aplicados.

Um fator que não foi levado em consideração neste trabalho, foi a assimetria existente no hipocampo, pois avaliamos o hipocampo direito ou esquerdo aleatoriamente. Lister e col. encontrou uma diferença de 21% menos neurônios em CA1 e 6% menos em CA3/CA2 no hemisfério direito em relação ao esquerdo. Porém, a desnutrição pré-natal, também avaliada, reduziu o número de neurônios de CA1 somente, de forma simétrica (Lister *et al.*, 2006). Como realizamos vários cortes, estas possíveis variações não devem ter causado viés.

## 6 CONCLUSÕES

Comparando os paradigmas de desnutrição intra e extra-uterina, observamos que somente a desnutrição extra-uterina reduziu de forma significativa o peso corporal e cerebral dos animais estudados.

O paradigma de desnutrição extra-uterina apresentou maior redução no limiar para crises convulsivas.

A comparação entre os efeitos dos diferentes paradigmas de desnutrição na morfometria do hipocampo não apresentou diferença significativa em relação à contagem celular. Este resultado sugere não ter ocorrido influência de estresse no modelo de desnutrição extra-uterina utilizado.

A desnutrição intra-uterina por se reduziu a contagem celular nas regiões CA2 e CA3, sem, contudo, alterar de forma significativa o peso corporal e cerebral, assim como, o limiar para crise.

As crises convulsivas causaram um aumento de células em animais nutridos, que, pela metodologia empregada, não é possível afirmar que tenha sido devido à neurogênese.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aicardi, J. Epileptic syndromes in childhood. Epilepsia, v.29, n.3, p.1-5. 1998.
- Akman, C. Z. Q.; Liu, X.; Holmes, G. L. Effect of food deprivation during early development on cognition and neurogenesis in the rat. Epilepsy and Behavior, v.5, n.4, p.446-454. 2004.
- Altman, J. e Das, G. D. Autoradiographic and histological evidence of posnatal hippocampal neurogenesis in rats. J. Comparative Neurol., v.124, p.319-336. 1965.
- Bayer, S. A. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. J Comp Neurol, v.190, n.1, Mar 1, p.87-114. 1980.
- Bedi, K. S. Early-life undernutrition causes deficits in rat dentate gyrus granule cell number. Experientia, v.47, n.10, p.1073-1074. 1991.
- \_\_\_\_\_. Effects of undernutrition during early-life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. J. Comparative Neurol., v.311, n.3, p.425-433. 1991b.
- Bedi, K. S. e Bhide, P. G. Effects of environmental diversity on cerebral morphology. Early Hum Dev, v.17, n.2-3, Aug-Sep, p.107-43. 1988.
- Ben-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. Nat Rev Neurosci, v.3, n.9, Sep, p.728-39. 2002.
- Bengzon, J.; Kokaia, Z.; Elmér, E.; *et al.* Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, p.10432-10437. 1997.
- Benitez-Bribiesca, L.; De La Rosa-Alvarez, I.; Mansilla-Olivares, A. Dendritic spine pathology in infants with severe protein-calorie malnutrition. Pediatrics, v.104, n.2, Aug, p.e21. 1999.
- Bohrer, M. S. A. Nutrição parental: quando iniciar. 2007. Disponível em <[www.paulomargotto.com.br/documentos/aa\\_precoce\\_nutrição.doc](http://www.paulomargotto.com.br/documentos/aa_precoce_nutrição.doc)>. Acesso em jun. 2008.
- Bohn, M. C. Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone. Neuroscience, v.5, n.11, p.2003-12. 1980.
- Bohn, M. C. e Lauder, J. M. Cerebellar granule cell genesis in the hydrocortisone-treated rats. Dev Neurosci, v.3, n.2, p.81-9. 1980.
- Bonthius, D. J. e West, J. R. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure. Alcohol Clin Exp Res, v.14, n.1, Feb, p.107-18. 1990.

\_\_\_\_\_. Permanent neuronal deficits in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. Teratology, v.44, n.2, Aug, p.147-63. 1991.

Boukhezra, O.; Riviello, P.; Fu, D. D.; *et al.* Effect of the postictal state on visual-spatial memory in immature rats. Epilepsy Res, v.55, n.3, Aug, p.165-75. 2003.

Bronzino, J. D.; Austin-Lafrance, R. J.; Siok, C. J.; *et al.* Effect of protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioral measures. Brain Res, v.384, n.2, Oct 8, p.348-54. 1986.

Chase, H. P.; Dabiere, C. S.; Welch, N.N.; *et al.* Intrauterine undernutrition and brain development. Pediatrics, v.47, p.491-506. 1971.

Chase, H. P.; Dorsey, J.; McKhann, G. M. The effect of malnutrition on the synthesis of a myelin lipid. Pediatrics, v.40, n.4, Oct, p.551-9. 1967.

Chesnut, T. J. e Swann, J. W. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in immature hippocampus. Epilepsy Res, v.2, n.3, May-Jun, p.187-95. 1988.

Clark, G. M.; Zamenhof, S.; Van Mathens, E.; *et al.* The effect of prenatal malnutrition on dimensions of cerebral cortex. Brain Res, v.54, May 17, p.397-402. 1973.

Culley, W. J. e Lineberger, R. O. Effect of undernutrition on the size and composition of the rat brain. J Nutr, v.96, n.3, Nov, p.375-81. 1968.

Da Silva, A. V. e Cavalheiro, E. A. Epilepsia: uma janela para o cérebro. Revista Multiciência, n. 3. 2004.

Debassio, W. A.; Kemper, T. L.; Tonkiss, J.; *et al.* Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in hippocampal dentate gyrus. Brain Research Bulletin, v.41, n.6, p.379-383. 1996.

Debassio, W. A.; Kemper, T. L.; Galler, J. R.; *et al.* Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. Brain Res Bull, v.35, n.1, p.57-61. 1994.

Del Angel-Meza, A. R.; Ramirez-Cortes, L.; Olvera-Cortes, E.; *et al.* A tryptophan-deficient corn-based diet induces plastic responses in cerebellar cortex cells of rat offspring. Int J Dev Neurosci, v.19, n.4, Jul, p.447-53. 2001.

Diaz-Cintra, S.; Cintra, L.; Ortega, A.; *et al.* Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. J Comp Neurol, v.292, n.1, Feb 1, p.117-26. 1990.

Dickerson, J. W. e Dobbing, J. Some peculiarities of cerebellar growth in pigs. Proc R Soc Med, v.59, n.11 Part 1, Nov, p.1088. 1966.

Do Espírito Santo, J. L.; Portuguese, M. W.; Nunes, M. L. Status cognitivo-comportamental de prematuros de baixo peso ao nascimento em idade pré-escolar que vivem em país em desenvolvimento JPED, v.85, n.1. 2009.

Dobbing, J. The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the Brain. Proc R Soc Lond B Biol Sci, v.159, Feb 18, p.503-9. 1964.

Dobbing, J. e Sands, J. Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. Biol Neonate, v.19, n.4, p.363-78. 1971.

Dzhala, V. I. e Staley, K. J. Excitatory actions of endogenously released GABA contribute to initiation of ictal epileptiform activity in the developing hippocampus. J Neurosci, v.23, n.5, Mar 1, p.1840-6. 2003.

Fernandes, J. Epidemiology of epileptic syndromes in Porto Alegre: a populational study. Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

Fountain, N. B. Status epilepticus: risk factors and complications. Epilepsia, v.41 Suppl 2, p.S23-30. 2000.

Gherpelli, J. L. D. e Lefèvre, A. B. Convulsões neonatais. Pediatria(USP), v.3, p.208-213. 1981.

Gietzen, D. W.; Dixon, K. D.; Truong, B. G.; *et al.* Indispensable amino acid deficiency and increased seizure susceptibility in rats. Am J Physiol, v.271, n.1 Pt 2, Jul, p.R18-24. 1996.

Gray, W. P. e Sundstrom, L. E. Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. Brain Res, v.790, n.1-2, Apr 20, p.52-9. 1998.

Guerreiro, C. A. M.; Guerreiro, M. M.; Cendes, F.; *et al.* In: (Ed.). Epilepsia. São Paulo: Editora Lemos, 2000

Gulledge, A. T. e Stuart, G. J. Excitatory actions of GABA in the cortex. Neuron, v.37, n.2, Jan 23, p.299-309. 2003.

Gundersen, H. J. G.; Bendtsen, T.F.; Korbo, L.; *et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. APMIS, v.96, p.379-394. 1998.

Gundersen, H. J. G. e Jensen, E. B. The efficiency of sistematic samplig in stereology and its prediction. J. Microsc., v.147, p.229-263. 1987.

Gurmini, J.; Cecílio, W. A. C.; Schuler, S. L.; *et al.* Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. J Bras Patol Med Lab, v.41, n.4, p.271-278. 2005.

Hales, C. N. e Barker, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia, v.35, n.7, Jul, p.595-601. 1992.

Hall, A.; Khanh, L. N.; Son, T. H.; *et al.* An association between chronic undernutrition and educational test scores in Vietnamese children. Eur J Clin Nutr, v.55, n.9, Sep, p.801-4. 2001.

Hoffmann, A. F.; Zhao, Q.; Holmes, G. L. Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the "two-hit hypothesis". Epilepsy Behav, v.5, n.6, Dec, p.873-7. 2004.

Hauser, W. A. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. Epilepsia, v.35, n.2, p.1-6. 1994.

Howard, C. V. e Reed, M. G. Unbiased Stereology: Bios Scientific Publishers. 1998

Huang, L. T.; Lai, M. C.; Wang, C. L.; *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, v.145, n.2, Nov 12, p.213-8. 2003.

Insel, T. R.; Miller, L. P.; Gelhard, R. E. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain--I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. Neuroscience, v.35, n.1, p.31-43. 1990.

Jahnke, S. e Bedi, K. S. Undernutrition during early life increases the level of apoptosis in the dentate gyrus but not in the CA2+CA3 region of the hippocampal formation. Brain Res, v.1143, Apr 27, p.60-9. 2007.

Joca, S. R. L.; Padovan, C. M.; Guimarães, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. Revista Brasileira de Psiquiatria v.25, n.2, p.46-51. 2003.

Jordan, T. C.; Howells, K.F.; Mcnaughton, N.; *et al.* Effects of early undernutrition on hippocampal development and function. Res Exp Med(Berl), v.180, n.3, p.201-7. 1982.

King, R. S.; Debassio, W. A.; Kemper, T. L.; *et al.* 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, v.150, n.1, May 19, p.9-15. 2004.

Leuba, G. e Rabinowicz, T. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex.I. Cellular densities, cortical volume and total number of cells. Exp Brain Res, v.37, n.2, p.283-298. 1979.

Leuba, G. e 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, v.37, n.2, p.299-308. 1979b.



Levine, S.; Huchton, D. M.; Weiner, S. G.; *et al.* Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. Dev Psychobiol, v.24, n.8, Dec, p.547-58. 1991.

Liga Brasileira de Epilepsia. Disponível em: <www.epilepsia.org.br>. Acesso em: jun. 2008.

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

Lister, J. P.; Tonkis, J.; Blatt, G. J.; *et al.* Asymmetry of neuron numbers in the hippocampal formation of prenatally malnourished and normally nourished rats: a stereological investigation. Hippocampus, v.16, n.11, p.946-58. 2006.

Liu, H.; Kaur, J.; Dashtipour, K.; *et al.* Suppression of hippocampal neurogenesis is associated with developmental stage, number of perinatal seizure episodes, and glucocorticosteroid level. Exp Neurol, v.184, n.1, Nov, p.196-213. 2003.

Liu, X.; Muller, R. U.; Huang, L. T.; *et al.* Seizure-induced changes in place cell physiology: relationship to spatial memory. J Neurosci, v.23, n.37, Dec 17, p.11505-15. 2003.

Logroscino, G.; Hersdorffer, D.C.; Cascino, G.; *et al.* Time trends in incidence, mortality and case fatality after first episode of status epilepticus. Epilepsia, v.42, n.8, p.1031-1035. 2001.

Lombroso, C. T.; Nunes, M. L.; Da Costa, J. C. Crises convulsivas no recém-nascido. In: J. C. Da Costa, Palmira, A., Yacubian, E.M., Cavalheiro, E.A. (Ed.). Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias. São Paulo: Editora Lemos, 1998. Crises convulsivas no recém-nascido, p.173-201

Lopes, D. K. Considerações éticas e legais sobre utilização de animais em experimentação científica. JLBE, v.5, p.19-22. 1992.

Lorente De Nó, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. Continuation of the study of the ammonic system. J. Psychol. Neurol., v.46, p.113-177. 1934.

Mandarin-De-Lacerda, C. A. Métodos Quantitativos em Morfologia.: Editora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 1995

\_\_\_\_\_. Stereological tools in biomedical research. Anais da Academia brasileira de Ciências, v.75, n.4, p.469-486. 2003.

Mccabe, B. K.; Silveira, D. C.; Cilio, M. R.; *et al.* Reduced neurogenesis after neonatal seizures. J Neurosci, v.21, n.6, Mar 15, p.2094-103. 2001.

Miller, L. P.; Johnson, A. E.; Gelhard, R. E.; *et al.* The ontogeny of excitatory amino acid receptors in the rat forebrain--II. Kainic acid receptors. Neuroscience, v.35, n.1, p.45-51. 1990.

Mirescu, C.; Peters, J. D.; Gould, E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. Nat Neurosci, v.7, n.8, Aug, p.841-6. 2004.

Monte, C. M. G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. Jornal de Pediatria, v.76, n.3, p.285-297. 2000.

Morgane, P. J.; Austin-Lafrance, R.; *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. Neurosci Biobehav Rev, v.17, n.1, Spring, p.91-128. 1993.

Morgane, P. J.; Austin, K.; Bronzino, J. D.; *et al.* Power spectral analysis of hippocampal and cortical EEG activity following severe prenatal protein malnutrition in the rat. Brain Res, v.354, n.2, Oct, p.211-8. 1985.

Nakagawa, E.; Aimi, Y.; Yasuhara, O. ;*et al.* Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. Epilepsia, v.41, n.1, Jan, p.10-8. 2000.

Nunes, M.; Batista, B.; Micheli, F.; *et al.* Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. Jornal de Pediatria, v.78, n.1. 2002.

Nunes, M. L.; Da Costa, J. C.; Godinho, C.C.; *et al.* Prognóstico de recém nascidos com convulsões: aspectos clínicos e eletroencefalográficos. Jornal da Liga Brasileira de Epilepsia v.7, n.1, p.27-30. 1994.

Nunes, M. L.; Liptáková, S.; Velísková, J.; *et al.* Malnutrition increases dentate granule cell proliferation in immature rats after status epilepticus. Epilepsia, v.41, n.6, p.48-52. 2000.

Nunes, M. L.; Teixeira, C.G.; Fabris, I.; *et al.* Evaluation of the nutritional status in institutionalized children and its relationship to the development of epilepsy. Nutritional Neuroscience v.2, p.139-145. 1999.

Owens, D. F.; Boyce, L. H.; Davis, M. B. E.; *et al.* Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. J Neurosci, v.16, n.20, Oct 15, p.6414-23. 1996.

Parent, J. M. The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. Epilepsy Research, v.50, p.179-189. 2002.

Paxinos, G. e Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, v.4. 1998

Porter, B. E.; Maronski, M.; Brooks-Kayal, A. R. Fate of newborn dentate granule cells after early life status epilepticus. Epilepsia, v.45, n.1, Jan, p.13-9. 2004.

Randt, C. T. e Derby, B. M. Behavioral and brain correlations in early life nutritional deprivation. Arch Neurol, v.28, n.3, Mar, p.167-72. 1973.

- Rioux, L.; Nissanov, J.; Lauber, K.; *et al.* Distribution of microtubule-associated protein MAP2-immunoreactive interstitial neurons in the parahippocampal white matter in subjects with schizophrenia. Am J Psychiatry, v.160, n.1, Jan, p.149-55. 2003.
- Ritchter, C. P. Biological clocks in medicine and psychiatry: shock-phase hypothesis. . Proceedings of the National Academy Of Sciences of the Unites States of America, v.46, p.1506-1530. 1965.
- Rodriguez, O. T. S.; Szarfarc, S.C.; Benicio, M.H.A. Anemia e desnutrição maternas e sua relação com o peso ao nascer. Saúde Pública, v.25, n.3, p.193-197. 1991.
- Sankar, R.; Shin, D.; Liu, H; *et al.* Granule cell neurogenesis after status epilepticus in the immature rat brain. Epilepsia, v.41 Suppl 6, p.S53-6. 2000.
- Sapolsky, R. M. e Meaney, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. Brain Res, v.396, n.1, Mar, p.64-76. 1986.
- Schlessinger, A. R.; Cowan, W. M.; Swanson, L.W. The time of origin of neurons in Ammon's horn and the associated retrohippocampal fields. Anat Embryol (Berl), v.154, n.2, Aug 18, p.153-73. 1978.
- Schmitz, C. e Hof, P. R. Design-based stereology in neuroscience. v.130, p.813-831. 2005.
- Schoenfeld, N. M.; Leathem, J. H.; Rabii, J. Maturation of adrenal stress responsiveness in the rat. Neuroendocrinology, v.31, n.2, Aug, p.101-5. 1980.
- Scott, B. W.; Wang, S.; Burnham, W. M.; *et al.* Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. Neurosci Lett, v.248, n.2, May 29, p.73-6. 1998.
- Seitelberger, F.; Lassmann, H.; Hornykiewicz, O. Some mechanisms of brain edema studied in a kainic acid model. Acta Neurobiol Exp (Wars), v.50, n.4-5, p.263-7. 1990.
- Sharma, S. K.; Behari, M.; Maheshwari, M. C.; *et al.* Seizure susceptibility & intra rectal sodium valproate induced recovery in developing undernourished rats. Indian J Med Res, v.92, Apr, p.120-7. 1990.
- Sharma, S. K.; Selvamurthy, W.; Maheshwari, M. C.; *et al.* Kainic acid induced epileptogenesis in developing normal & undernourished rats-a computerised EEG analysis. Indian J Med Res, v.92, Dec, p.456-66. 1990b.
- Silva, L. F. G.; Nunes, M. L.; Da Costa, J. C. Risks factors for developing epilepsy after neonatal seizures. Pediatr Neurol, v.30, p.271-277. 2004.
- Siqueira, A. A.; Tanaka, A. C.; Junior, C. C.; *et al.* A utilização de uma curva ponderal de gestantes normais no diagnóstico de desnutrição intra-uterina. Saúde Pública, v.9, n.495-506. 1975.

\_\_\_\_\_. Influência da altura e ganho de peso materno e da idade gestacional sobre o peso do RN. Saúde Pública, v.9, p. 331-342. 1975b.

Smart, J. L.; Dobbing, J.; Adlard, B. P.; *et al.* Vulnerability of developing brain: relative effects of growth restriction during the fetal and suckling periods on behavior and brain composition of adult rats. J Nutr, v.103, n.9, Sep, p.1327-38. 1973.

Staley, K. J. Wrong-way chloride transport: is it a treatable cause of some intractable seizures? Epilepsy Curr, v.6, n.4, Jul-Aug, p.124-7. 2006.

Stern, W. C.; Forbes, W. B.; Resnick, O.; *et al.* Seizure susceptibility and brain amine levels following protein malnutrition during development in the rat. Brain Res, v.79, n.3, Oct 25, p.375-84. 1974.

Suchecki, D.; Rosenfeld, P.; Levine, S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. Brain Res Dev Brain Res, v.75, n.2, Oct 15, p.185-92. 1993.

Susser, E.; Neugebauer, R.; Hoek, H. W.; *et al.* Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. Arch Gen Psychiatry, v.53, n.1, Jan, p.25-31. 1996.

Tremblay, E.; Roisin, M. P.; Represa, A.; *et al.* Transient increased density of NMDA binding sites in the developing rat hippocampus. Brain Res, v.461, n.2, Oct 4, p.393-6. 1988.

Van Oers, H. J.; De Kloet, E. R.; Whelan, T.; *et al.* Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. J Neurosci, v.18, n.23, Dec 1, p.10171-9. 1998.

Volpe, J. J. Neurology of the newborn. New York: WB Saunders. 1995

Wasterlain, C. G.; Fujikawa, D.G.; Dwyer, B. E. Selective vulnerability of neuronal subpopulations during ontogeny reflects discrete molecular events associated with normal brain development. In: C. G. Wasterlain, Vert P. (Ed.). Neonatal Seizures. New York: Raven Press, 1990. Selective vulnerability of neuronal subpopulations during ontogeny reflects discrete molecular events associated with normal brain development., p.69-82

Weiss, I. C. e Feldon, J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. Psychopharmacology (Berl), v.156, n.2-3, Jul, p.305-26. 2001.

West, C. D. e Kemper, T. L. The effect of a low protein diet on the anatomical development of the rat brain. Brain Res, v.107, n.2, May 7, p.221-37. 1976.

West, J. R. Fetal alcohol-induced brain damage and the problem of determining temporal vulnerability: a review. Alcohol Drug Res, v.7, n.5-6, p.423-41. 1987.

West, M. J. e Gundersen, H. J. G. Unbiased stereological estimation of the number of neurone in the human hippocampus. J Comp Neurol, v.296, p.1-22. 1990.

Winick, M. e Noble, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. J Nutr, v.89, n.3, Jul, p.300-6. 1966.

Zhang, L. X.; Levine, S.; Dent, G.; *et al.* Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. Brain Res Dev Brain Res, v.133, n.1, Jan 31, p.1-11. 2002.

ANEXO A: cópia do email de submissão do artigo

**Mensagem original**

**De:** mari.florian < mari.florian@bol.com.br >

**Para:** CPrasad@mail.twu.edu

**Assunto:** Article submission to Nutritional Neuroscience

**Enviada:** 24/02/2010 20:50

Dear Professor Chandan Prasad,

I'm submitting the original article called "Effects of intra-uterine and early extra-uterine malnutrition in the seizure threshold and in hippocampus morphology of pup rats" for your evaluation. I try to send the figures in required format but they make the message exceed the maximum attachment size. So, how can I send?

Thank you for your time and consideration.

Sincerely yours

Mariana Florian

-----  
Medicine and Health Sciences Postgraduate Program: Neuroscience  
Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul

Street address:

Av. Ipiranga, 6681 - 2º andar, Jardim Botânico  
90610-000  
Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 33203318

E-mail: mari.florian@bol.com.br

ANEXO B: Artigo submetido à revista Nutritional Neuroscience

**EFFECTS OF INTRA-UTERINE AND EARLY EXTRA-UTERINE MALNUTRITION  
IN THE SEIZURE THRESHOLD AND IN HIPPOCAMPUS MORPHOMETRY OF  
PUP RATS**

**Mariana Lorenzet Florian<sup>\*,#</sup>**

**Magda Lahorgue Nunes<sup>\*\*</sup>**

\* Biomedical

\*\* Associate Professor of Neurology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) School of Medicine, Porto Alegre, RS, Brazil

# Corresponding author

Neurosciences Laboratory, Institute of Biomedical Research , PUCRS, Porto Alegre-  
RS, Brazil.

Mariana Lorenzet Florian

Medicine and Health Sciences Postgraduate Program: Neuroscience, PUCRS, Av.  
Ipiranga, 6681 – 2º andar, Jardim Botânico, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: + 5551 33203318 E-mail: mari.florian@bol.com.br

Magda Lahorgue Nunes

Division of Neurology, Hospital São Lucas, PUCRS, Avenida Ipiranga 6690, Jardim  
Botânico, sala 322, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: + 5551 33203318

Fax: + 5551 33394936 E-mail: nunes@pucrs.br

**Abstract**

We evaluate the influence of different malnutrition paradigms (intra-uterine x extra-uterine) in body and brain weight, in seizure threshold and in hippocampus morphometry, in developing rats. Intra-uterine malnutrition model consisted in reduce by half the ration offered to pregnant female; extra-uterine malnutrition consisted of progressive limitation of lactation, from P2 to P15. Seizure induction was accomplished by exposure to flurotil, at P15. At the same day animals were sacrificed. Morphometric analysis was based on hippocampal pyramidal and granular cells estimate number, through volume calculation and cellular density. Extra-uterine malnutrition reduced pups body ( $p<0,03$ ) and brain weight ( $p=0,01$ ), as seizure threshold ( $p<0,01$ ), regarding controls and intra-uterine malnourished animals. Intra-uterine malnutrition reduced neuronal number in CA2-CA3 regions ( $p<0,04$ ). Significant difference was not found between malnutrition paradigms regarding cell number in any hippocampal regions. In dentate gyrus, a significant cell increase was observed ( $p=0,03$ ) in nourished group exposed to seizures, regarding control group.

**Keywords:** early malnutrition, seizure, hippocampus, morphometry, rodent model.



## 1 Introduction

Besides the world reduction of prevalence of infantile malnutrition, it is still nowadays the most important health problem in underdeveloped, or third world countries. More than 50% deaths's children, smaller than five years occur in these countries is influenced by the malnutrition, in some of its forms <sup>1</sup>.

The period of larger cerebral growth in mammals is the larger period of vulnerability to the malnutrition. For some researchers, this period would be the postnatal <sup>2,3</sup>, while for another, would be the prenatal <sup>4</sup>.

The nutritional deficiency during pregnancy is strongly linked to low birth weight and to the incidence of prematurity. According to Rodriguez and collaborators, the incidence of low birth weight of children from malnourished mothers was significantly when compared to well nourished women at the end of pregnancy <sup>5</sup>.

The role of the maternal nutritional state regarding the fetus growth and development has been very argued through time and the concerning opinions suffered a great change. The concept of the fetal parasitism in which, without taking in account any maternal deficit, the fetus withdraws and uses the nutrients that it needs, is not more accepted. There are many evidences, nowadays, that maternal nutritional lacks can provoke not only the intra-uterine growth deficient, like the decrease of the cellular population in the different sectors of the fetal economy, especially in that tells respect to the central nervous system <sup>6</sup>.

Neuroanatomic studies, since a long time bring evidences that hippocampus is affected by early malnutrition. According to Cintra et al., the size of the granular cells of the dentate gyrus and the dendritic ramifications showed to be reduced <sup>7</sup>, as well as the number of granular cells, remaining even so after nutritional rehabilitation.

Other studies also reveal a hippocampal pyramidal cells decrease after malnutrition. Jordan et al. demonstrated a permanent reduction in the number of cells in the regions CA (Amon's horn)1, CA2, CA3, CA4 and dentate gyrus<sup>8</sup>.

Seizures constitute the most frequent of the neurological manifestations in the neonatal period<sup>9-11</sup>.

The relation between malnutrition and the early seizures is not totally elucidated yet. There are studies that suggest that the malnourished children could be more prone to seizures than the well-nourished<sup>12</sup>. There are still several studies with animals that suggest a decrease in the seizure threshold in epilepsy or seizures models<sup>13-18</sup>. Moreover, the malnutrition affects the standards maturation of electroencephalogram (EEG) in rat, and the synaptic efficacy<sup>19</sup>.

The present study proposal was to evaluate the influence of two different malnutrition paradigms in the corporeal and cerebral weight, in the seizure threshold and in hippocampus morphometry of rats in development.

## 2 Methodology

### 2.1 Animals

Twelve pregnant Wistar females and her litters were used, of which 45 male pups served for the experiment. The animals were treated as the protocol of rules and cares for laboratory animals<sup>20</sup> and were kept, during all experimental period, in Institute of Biomedic Research of PUCRS, facilities, lodged in system of individualized and acclimatized cages (one cage system). All of them had liberated access to the ration and water (except when the protocol of maternal malnutrition was applied) and were maintained in 12-hour dark/light cycle. The pups age was

calculated in life days after the birth, being P0 considered the birth day and the subsequent days as P1 to P15.

The litters were randomly allocated in six groups divided into two experiments (three groups for each experiment). Both experiments had around six to nine rats per group.

The first experiment consisted in evaluate the influence of malnutrition paradigm in the seizure threshold and in the hippocampus morphometry, both at P15.

The second experiment analyzed the relationship between malnutrition paradigm and hippocampus morphometry, at P15.

The animals of the group 1 from both experiments were submitted to the intra-uterine malnutrition paradigm or maternal malnutrition. The animals of the group 2 of each experiment were submitted to the extra-uterine malnutrition paradigm at P2 to P15. The animals of the group 3 of each experiment had liberated access to the nursing female since the birth and served as control. All rats were weighted daily.

## 2.2 Intra-uterine malnutrition paradigm

In this paradigm the dams had a 50% reduction of the received ration. The malnutrition period initiated since gestation confirmation until the pups birth<sup>21</sup>.

## 2.3 Extra-uterine malnutrition paradigm

This malnutrition paradigm consisted of the progressive limitation of the lactation by removing the nursing female from the litter. The deprivation period started at P2, with two hours of duration, and it was progressively increased from two hours a day up to 12 hours a day (P7 to P15). The malnutrition period was kept by 15

days. During the separation, the pups were kept close in heated cage, so that the corporeal temperatures kept around 34° C. The control animals remained always with the dam with free access to the lactation<sup>13</sup>.

#### 2.4 Seizure induction model

Flurotil [again-(2,2,2-trifluorethyl)ether] is a volatile and powerful agent, GABA A receptors blocker, that stimulates quickly the central nervous system, inducing generalized seizures in few minutes. Flurotil was always used in an air-tight chamber, inside the laboratory chapel. Adapted to the chamber, we used an infusion bomb for leak control<sup>13</sup>.

The seizure induction model used consisted in keep the animals closed in Flurotil exposed chamber, with 4-6 drops per minute, until first tonic-clonic seizure occurred<sup>22, 23</sup>. Soon after, the pups recovered in heated cage and in ambient air, returning to the remaining of the litter after the clinical seizures have ceased completely.

#### 2.5 Histology

At P15, the animals were anesthetized with Xilasine 2% and Ketamine 5% and were transcardially perfused with saline solution and paraformaldehyde 4%.

After the surgical excision of the brains, the material was weighed and put in fixative material – paraformaldehyde 4% for a period from 24 to 48 hours. After, it was washed in current water for 20 minutes. The pieces were put in the alcoholic graduation processor from 70 to 100% and kept with xylol during 12 hours. After, the same was embedded in paraffin to later sectioning and staining.

The brains were coronal sectioned in microtome with a thickness of 5  $\mu\text{m}$ . The sections were distributed with the interval of two collected sections (one of them was analyzed) for ten eliminated, as Cavalieri's method <sup>24</sup>. The sections were stained by cresyl violet method, also known as Nissl.

The hippocampus, as well as its subdivisions, were identified according to the atlas for rat brain Paxinos & Watson (1998) <sup>25</sup>.

## 2.6 Morphometry

The stereological procedures were accomplished with microscope equipped with lenses of 4x, 10x, 40x and 100x magnifications (Olympus BX40).

### 2.6.1 Volume calculation

For the volume counting, the interest areas were selected after low magnification (4x) in the hippocampal areas CA1, CA2, CA3, CA4 and dentate gyrus, according to Lorente de Nó's division <sup>26</sup>. The images were digitized in fixed opening (4x) by the CCDQi capture camera in the software Image Pro Plus 6.0. The edges of each hippocampal region were traced with the computer mouse.

The volume estimate was obtained through the average of all the areas (corresponding to each section) of a brain multiplied by distance among sections, represented by  $V = \Sigma A.T$  and presented in  $\text{mm}^2$  ( $V$ = Volume;  $\Sigma A$ = sum total of the areas;  $T$ = distance among sections) <sup>24</sup>.

### 2.6.2 Cellular density calculation

The neuronal cellular counting was accomplished by two-dimensional quantitative test points system made by Image Pro Plus 6.0 software (Capture Media Cybernetics, USA) <sup>27</sup>.

Nissl's stain mark mainly Nissl's bodies, constituted by rugose endoplasmic reticulum, responsible for protein synthesis, present in the neuronal cytoplasm, this way, the neuronal cellular body was considered the representation of a neuron. The  $Q_A$  (number of the neurons in the test area) was the number of neuronal bodies seen in only one focus, when they are totally or partially inside the study region. The glial cells were identified and excluded from the counting by their relatively smaller size and lack of stained cytoplasm <sup>28</sup>.

In each analyzed hippocampal region, an average from four counted fields was done, in order to equilibrate the existing cellular density difference of a field to another. The counting was made in right or left hippocampus randomly, in an area test of 91582  $\mu\text{m}^2$ .

To obtain an impartial counting of the structure, we used bars with two prohibited lines (exclusion) and two acceptable lines (inclusion); when the "object" touched the prohibited lines it cannot be counted, however when it crossed the acceptable lines or was completely inside the area it should be counted <sup>29</sup>.

The numeric density of neurons ( $N_v$ ) could be estimated by the following formula:  $N_v = Q_A/A_T \cdot e$  ( $1/\text{mm}^2$ ); where  $N_v$ = numeric density of neurons;  $Q_A$ = number of the neurons in the test area;  $A_T$ = test area and  $e$ = thickness (Mandarin-De-Lacerda, 1995; Mandarin-De-Lacerda, 2003).

### 2.6.3 Total cells number estimate

From the data obtained in the evaluation of the cells numeric density (Nv) and of the volume calculation, we applied another formula and easily obtained referring data to the total neurons number estimate:  $N = V \cdot Nv$ ; where N= cells total number; V= volume estimate and Nv= numeric density<sup>32</sup>.

## 2.7 Statistical analysis

The variables were compared among groups through the ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test and Duncan's Test, with  $\alpha = 0,05$  significance level, in SPSS 11.5 program.

## 3 Results

### 3.1 Body weight

Body weight variation was observed among animals of the different groups from P0 to P15.

At P7, we evidenced significant weight difference among animals submitted to the protocol of extra-uterine malnutrition (Extra-uterine malnutrition without seizure-EM group) with the groups Adequate nutrition with seizure (NS) ( $p=0,03$ ), Control nourished (N) ( $p=0,004$ ) and Intra-uterine malnutrition without seizure (IM) ( $p=0,01$ ). At P15, both groups with extra-uterine malnutrition had significantly inferior weight, regarding the same of P7. The Extra-uterine malnutrition with seizure (EMS) group has a significance of  $p=0,007$  with NS,  $p=0,0001$  with N and  $p=0,02$  with IM. The EM group has a significance of  $p=0,0001$  regarding the same three groups. (figure 2).

The comparison between animals birth weight submitted to the intra-uterine malnutrition paradigm and the control was similar (respectively  $6.76 \text{ grams} \pm 0,687$  and  $6.20 \pm 0,388$ ;  $p < 0,05$ ).

### 3.2 Brain weight

Regarding the brain weight verified in P15, we observed significant difference among groups NS and EM ( $p = 0,01$ ) (table 1).

### 3.3 Seizure threshold

The group EMS presented the minor seizure threshold regarding the groups Intra-uterine malnutrition with seizure (IMS) ( $p = 0,01$ ) and NS ( $p = 0,0001$ ) (table 2).

### 3.4 Neuronal number of hippocampal regions

In CA1 and CA4 regions, we did not find significant difference in the neuronal total number estimate among groups, for all hippocampus regions analyzed. In CA2 region, the group IM demonstrated a smaller significant neuronal number than the nourished groups (NS with  $p = 0,001$  and N with  $p = 0,002$ ). In CA3, we evidenced significant difference between NS and IM groups, being this last with a reduced cellular number ( $p = 0,04$ ). In the dentate gyrus (DG), the NS group presented a larger significant cell number than the N group ( $p = 0,03$ ). Differences were not evidenced among groups (with and without seizures) submitted to the intra-uterine malnutrition paradigm and the groups submitted to extra-uterine malnutrition paradigm (table 3).



## 4 Discussion

The present study proposal was to evaluate the influence of two different malnutrition paradigms in the corporeal and cerebral weight, in the seizure threshold and in hippocampus morphometry of rats in development. Our interest was also to verify if the possible stress effects caused by dams separation in the extra-uterine malnutrition paradigm would cause *per se* modifications in hippocampus.

Regarding the malnutrition paradigm effectiveness, the most efficient observed in this sample was the extra-uterine. This effectiveness had already been proved in previous studies<sup>13, 33</sup>.

It is possible that the intra-uterine malnutrition model that was used, was not so effective by the fact of not being a hipoproteic model, or, because the malnutrition was not initiated before gestation confirmation, in order to guarantee a chronic malnutrition, as evidenced in other studies<sup>34, 35</sup>.

Regarding the brain weight, significant difference among groups was not observed, except by the animals of the Adequate nutrition with seizure (NS) group and Extra-uterine malnutrition without seizure (EM) group – with smaller brain weight in the EM. The fact that the Extra-uterine malnutrition with seizure (EMS) group did not present a minor brain weight can be due to the brain edema secondary to the seizure<sup>36, 37</sup>. Regarding the groups with intra-uterine malnutrition, like they didn't show a body weight reduction too, this result was already expected, since it is known that the brain is protected in detriment of other structures when under nutritional

insult<sup>38</sup>.

Regarding the seizure threshold, there was an influence of malnutrition, and the animals of the extra-uterine group presented significantly inferior threshold. Previous studies of our group, using flurotil had previously observed this tendency, without, however, significant results<sup>13</sup>. Previous studies with other seizure models also observed smaller threshold in malnourished animals<sup>14-18</sup>.

The hippocampal different regions cellular counting could be evaluated regarding two factors: presence x absence of seizure and intra x extra-uterine malnutrition.

Comparing the similar groups with and without seizures, there was a significant increase of neurons in the dentate gyrus of the Adequate nutrition with seizure (NS) group *versus* the Control nourished (N) group.

It is known that both acute and recurring seizures stimulate the cells progenitors proliferation in the dentate gyrus in adult rats<sup>39-42</sup>. Otherwise, in the immature brain, studies show that the status epilepticus does increase neurogenesis (Nunes, 2000; Sankar, Shin *et al.*, 2000; Porter, Maronski *et al.*, 2004), however, other data reveal that recurrent seizures result in a decreased neurogenesis (McCabe, Silveira *et al.*, 2001; Liu, Kaur *et al.*, 2003). We did not find previous studies referring to effects of acute seizures in new cells formation in young rats. Other factor to consider in face of this result is the time needed for the new cells generation, since the groups submitted to seizure were sacrificed at the same day of the seizure induction and perhaps the time for neurogenesis observation was not enough (Gray e Sundstrom, 1998; Nakagawa, Aimi *et al.*, 2000; Parent, 2002). This way, we can tell that the difference found regarding the number of cells of the Adequate nutrition

with seizure (NS) and Control nourished (N) groups, cannot be explained by neurogenesis. It is necessary new studies for a better investigation.

Comparing both malnutrition paradigms used, significant difference was not observed in the cellular counting among Intra-uterine malnutrition without seizure (IM) and Extra-uterine malnutrition without seizure (EM) groups, in any hippocampus region. This discovery is significant in the sense of excluding the possibility of the separation stress caused by the model be responsible for a decreased cellular counting, diminished neurogenesis or increased cellular apoptosis, as demonstrated by Zhang and collaborators, among others<sup>48-50</sup>.

Young rats generally do not answer the small stressing factors, from P4 to P14, because they are inside the so called stress hiporesponsive period (SHRP)<sup>51</sup>. It has been suggested that this period would serve to protect the developing brain from glucocorticoid high levels<sup>52</sup>, which affect the hippocampus and cerebellum granular cells genesis in the two first postnatal weeks (Bohn, 1980; Bohn e Lauder, 1980). However, with the maternal separation, they secrete ACTH (adrenocorticotrophic hormone) and corticosterone (Levine, Huchton *et al.*, 1991). How much larger is the separation period, larger will be the responsiveness to the stress, with a peak point in twenty-four hours<sup>55</sup>.

In our experiments, we touched and keep contact with the pups during the maternal separation, moreover, they were kept in an environment without noises, with controlled temperature and adequate illumination. This way, we can tell that the induced stress was not so hard. Suchecki and col. say that the contact *per se* is enough to prevent ACTH increase provoked by the maternal separation<sup>55, 56</sup>.

Other important finding was the influence of the intra-uterine malnutrition *per*

se in the hippocampal cellular reduction. This has been previously described in literature<sup>34, 35, 58, 59</sup> and could explain, in an extrapolation attempt of the experimental discoveries for the clinic, the cognitive and behavioral deficits observed in premature neonates cohorts with very low weight from birth<sup>60</sup>.

It is known that moderated to severe periods of malnutrition before the two first years of life, can be associated to delay in the cognitive development and in the school performance in children (Hall, Khanh *et al.*, 2001).

There are hypotheses that the intra-uterine malnutrition is related with manifestations that would occur more lately in life, like the schizophrenia<sup>62, 63</sup>. Analyses post-mortem of the brain of schizophrenic patients show evidences of abnormal neuronal migration<sup>64</sup>. Del Angel-Meza and collaborators also show a delay in migration of granular cells in 21 day rats cerebellum cortex submitted to malnutrition pre and postnatal<sup>65</sup>.

A Jahnke and Bedi's study evaluated the degree of hippocampal cellular apoptosis after malnutrition since the gestation until P21. The malnourished animals had a significant increase of apoptotic cells in the dentate gyrus, however in the CA3-CA2 regions there was no differences<sup>66</sup>. The minor number of neurons seen in the group Intra-uterine malnutrition without seizure (IM) can be due to a process of cellular apoptosis, however our results differ regarding the region at issue, since this decreased number of cells was found exactly in CA2 and CA3.

The pyramidal cells of the Amon's horn are generated almost totally before the birth<sup>67</sup>, what can determine a minor vulnerability to them. Several studies have been demonstrating that these cells are very resistant to environmental insults that occur so much in the prenatal as in the postnatal period (West, 1987; Bonthius e West, 1990; 1991;

Debassio, 1994; Zhang, Levine *et al.*, 2002; Lister, Blatt *et al.*, 2005), 58, 59, 68-70; it does not agree with our results, since we verified a decrease in the number of pyramidal cells of CA3 and CA2 regions. This discrepancy can be related to different insults models - exposure to alcohol, protein malnutrition, malnutrition from E1 to P21 and 24 hours maternal separation; as well as the time difference in which the insults were applied.

A factor that was not taken into account in this study was the existing hippocampal asymmetry, because hippocampus right or left were randomly evaluated. Lister *et al.* found a difference of 21% less neurons in CA1 and 6% less in CA3/CA2 in the right hemisphere regarding the left. However, the prenatal malnutrition, evaluated also, reduced the number of neurons of CA1 only, in a symmetrical form (Lister, Tonkiss *et al.*, 2006). As we accomplish several sections, these possible variations should not have caused a bias.

In conclusion, regarding the reduction of body and brain weight and seizure threshold the extra-uterine malnutrition paradigm was more effective. Hippocampal morphometry was affected by intra-uterine malnutrition as showed by the decrease in the number of neurons in the CA2 and CA3 regions. Interestingly this model changed the hippocampal neuronal number, without changing the body and brain weight, as well as the seizure threshold. No significant differences were observed among malnutrition models regarding cellular count in the different hippocampal regions analyzed.

Acknowledgments

This work was supported by verbs from CNPq (process 478065/2006-0, edict MTC/CNPq 02/2006-Universal). We wish to thank Vinicius Duval da Silva PhD for assistance in stereologic procedures.

## References

- 1 Monte CMG. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. JPED, v.76, n.3, p.285-297. 2000.
- 2 Dobbing J. The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the Brain. Proc R Soc Lond B Biol Sci, v.159, Feb 18, p.503-9. 1964.
- 3 Dickerson J W e Dobbing J. Some peculiarities of cerebellar growth in pigs. Proc R Soc Med, v.59, n.11 Part 1, Nov, p.1088. 1966.
- 4 Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. Neurosci Biobehav Rev 1993; 17: 91-128
- 5 Rodriguez OTS, Szarfarc SC, Benicio MHA. Anemia e desnutrição maternas e sua relação com o peso ao nascer. Saúde Pública 1991; 25: 193-197
- 6 Siqueira AAF, Tanaka ACA, Júnior CC, et al. A utilização de uma curva ponderal de gestantes normais no diagnóstico de desnutrição intra-uterina. Saúde Pública 1975; 9
- 7 Diaz-Cintra S, Cintra L, Ortega A, et al. Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. J Comp Neurol 1990; 292: 117-26
- 8 Jordan TC, Howells KF, McNaughton N, et al. Effects of early undernutrition on hippocampal development and function. Res Exp Med(Berl) 1982; 180: 201-7
- 9 Lombroso CT, Nunes ML, Da Costa, JC. Crises convulsivas no recém-nascido. In: Da Costa JC, Palmmini, A., Yacubian, E.M., Cavalheiro, E.A., ed. Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias. São Paulo: Editora Lemos, 1998; 173-201

- 10 Nunes ML, Da Costa JC, Godinho CC, et al. Prognóstico de recém nascidos com convulsões: aspectos clínicos e eletroencefalográficos. *JLBE* 1994; 7: 27-30
- 11 Volpe JJ. *Neurology of the newborn.*: 3 Edition. New York: WB Saunders, 1995
- 12 Nunes ML, Teixeira CG, Fabris I, et al. Evaluation of the nutritional status in institutionalized children and its relationship to the development of epilepsy. *Nutr Neurosci* 1999; 2: 139-145
- 13 Nunes ML, Liptáková S, Velísková J, et al. Malnutrition increases dentate granule cell proliferation in immature rats after status epilepticus. *Epilepsia* 2000; 41: 48-52
- 14 Bronzino JD, Austin-Lafrance RJ, Siok CJ, et al. Effect of protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioral measures. *Brain Res* 1986; 384: 348-54
- 15 Gietzen DW, Dixon KD, Truong BG, et al. Indispensable amino acid deficiency and increased seizure susceptibility in rats. *Am J Physiol* 1996; 271: R18-24
- 16 Stern WC, Forbes WB, Resnick O, et al. Seizure susceptibility and brain amine levels following protein malnutrition during development in the rat. *Brain Res* 1974; 79: 375-84
- 17 Sharma SK, Selvamurthy W, Maheshwari MC, et al. Kainic acid induced epileptogenesis in developing normal & undernourished rats--a computerised EEG analysis. *Indian J Med Res* 1990; 92: 456-66
- 18 Sharma SK, Behari M, Maheshwari MC, et al. Seizure susceptibility & intra rectal sodium valproate induced recovery in developing undernourished rats. *Indian J Med Res* 1990; 92: 120-7
- 19 Morgane PJ, Austin K, Siok C, et al. Power spectral analysis of hippocampal and cortical EEG activity following severe prenatal protein malnutrition in the rat. *Brain Res* 1985; 354: 211-8
- 20 Lopes DK. Considerações éticas e legais sobre utilização de animais em experimentação científica. *JLBE* 1992; 5: 19-22
- 21 Gurmini J, Cecílio WAC, Schuler SL, et al. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. *J Bras Patol Med Lab* 2005; 41: 271-278
- 22 Hoffmann M, Schmitt F. Cognitive impairment in isolated subtentorial stroke. *Acta Neurol Scand* 2004; 109: 14-24
- 23 Boukhezra O, Riviello P, Fu DD, et al. Effect of the postictal state on visual-spatial memory in immature rats. *Epilepsy Res* 2003; 55: 165-75

- 24 Gundersen HJG, Jensen, E. B. The efficiency of sistematic samplig in stereology and its prediction. *J. Microsc.* 1987; 147: 229-263
- 25 Paxinos, G., Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, v.4. 1998
- 26 Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.*1934; 46: 113-177
- 27 Gundersen, H. J. G., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, v.96, p.379-394. 1998.
- 28 Schmitz, C. A. H., P. R. . Design-based stereology in neuroscience. v.130, p.813-831. 2005.
- 29 Howard C, Reed MG. *Unbiased Stereology*: Bios Scientific Publishers, 1998
- 30 Mandarin-de-Lacerda CA. *Métodos Quantitativos em Morfologia.*: Editora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 1995
- 31 Mandarin-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical reseach. *Anais da Academia brasileira de Ciências* 2003; 75: 469-486
- 32 West MJ, Gundersen HJG. Unbiased setereological estimation of the number of neurone in the human hippocampus. . *J Comp Neurol* 1990; 296: 1-22
- 33 Nunes M, Batista B, Micheli F, et al. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. *JPED* 2002; 78
- 34 Lister JP, Tonkiss J, Blatt GJ, et al. Asymmetry of neuron numbers in the hippocampal formation of prenatally malnourished and normally nourished rats: a stereological investigation. *Hippocampus* 2006; 16: 946-58
- 35 Debassio W, Kemper TL, Tonkiss J, et al. Effect of prenatal protein deprivation on posnatal granule cell generation in hippocampal dentate gyrus. *Brain Res Bull* 1996; 41: 379-383
- 36 Seitelberger F, Lassmann H, Hornykiewicz O. Some mechanisms of brain edema studied in a kainic acid model. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1990; 50: 263-7
- 37 Fountain NB. Status epilepticus: risk factors and complications. *Epilepsia* 2000; 41 Suppl 2: S23-30
- 38 Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35: 595-601



- 39 Bengzon J, Kokaia Z, Elmér E, et al. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 10432-10437
- 40 Parent JM. The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Research* 2002; 50: 179-189
- 41 Scott BW, Wang S, Burnham WM, et al. Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neurosci Lett* 1998; 248: 73-6
- 42 Gray WP, Sundstrom LE. Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res* 1998; 790: 52-9
- 43 Sankar R, Shin D, Liu H, et al. Granule cell neurogenesis after status epilepticus in the immature rat brain. *Epilepsia* 2000; 41 Suppl 6: S53-6
- 44 Porter BE, Maronski M, Brooks-Kayal AR. Fate of newborn dentate granule cells after early life status epilepticus. *Epilepsia* 2004; 45: 13-9
- 45 McCabe BK, Silveira DC, Cilio MR, et al. Reduced neurogenesis after neonatal seizures. *J Neurosci* 2001; 21: 2094-103
- 46 Liu H, Kaur J, Dashtipour K, et al. Suppression of hippocampal neurogenesis is associated with developmental stage, number of perinatal seizure episodes, and glucocorticosteroid level. *Exp Neurol* 2003; 184: 196-213
- 47 Nakagawa E, Aimi Y, Yasuhara O, et al. Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 2000; 41: 10-8
- 48 Zhang LX, Levine S, Dent G, et al. Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2002; 133: 1-11
- 49 King RS, DeBassio WA, Kemper TL, et al. 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* 2004; 150: 9-15
- 50 Mirescu C, Peters JD, Gould E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 2004; 7: 841-6
- 51 Schoenfeld NM, Leathem JH, Rabii J. Maturation of adrenal stress responsiveness in the rat. *Neuroendocrinology* 1980; 31: 101-5
- 52 Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res* 1986; 396: 64-76
- 53 Bohn MC. Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone. *Neuroscience* 1980; 5: 2003-12

- 54 Bohn MC, Lauder JM. Cerebellar granule cell genesis in the hydrocortisone-treated rats. *Dev Neurosci* 1980; 3: 81-9
- 55 Levine S, Huchton DM, Wiener SG, et al. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev Psychobiol* 1991; 24: 547-58
- 56 Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res* 1993; 75: 185-92
- 57 van Oers HJ, de Kloet ER, Whelan T, et al. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J Neurosci* 1998; 18: 10171-9
- 58 Debassio W, Kemper TL, Galler JR, et al. Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. *Brain Res Bull* 1994; 35: 57-61
- 59 Lister JP, Blatt GJ, DeBassio WA, et al. Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. *Hippocampus* 2005; 15: 393-403
- 60 do Espírito Santo J, Portuguez, MW, Nunes, ML. Status cognitivo-comportamental de prematuros de baixo peso ao nascimento em idade pré-escolar que vivem em país em desenvolvimento. *JPED* 2009; 85
- 61 Hall A, Khanh LN, Son TH, et al. An association between chronic undernutrition and educational test scores in Vietnamese children. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55: 801-4
- 62 Weiss IC, Feldon J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 156: 305-26
- 63 Susser E, Neugebauer R, Hoek HW, et al. Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch Gen Psychiatry* 1996; 53: 25-31
- 64 Rioux L, Nissanov J, Lauber K, et al. Distribution of microtubule-associated protein MAP2-immunoreactive interstitial neurons in the parahippocampal white matter in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 149-55
- 65 Del Angel-Meza AR, Ramirez-Cortes L, Olvera-Cortes E, et al. A tryptophan-deficient corn-based diet induces plastic responses in cerebellar cortex cells of rat offspring. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19: 447-53

- 66 Jahnke S, Bedi KS. Undernutrition during early life increases the level of apoptosis in the dentate gyrus but not in the CA2+CA3 region of the hippocampal formation. *Brain Res* 2007; 1143: 60-9
- 67 Schlessinger AR, Cowan WM, Swanson LW. The time of origin of neurons in Ammon's horn and the associated retrohippocampal fields. *Anat Embryol (Berl)* 1978; 154: 153-73
- 68 Bonthius DJ, West JR. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 1990; 14: 107-18
- 69 Bonthius DJ, West JR. Permanent neuronal deficits in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. *Teratology* 1991; 44: 147-63
- 70 West JR. Fetal alcohol-induced brain damage and the problem of determining temporal vulnerability: a review. *Alcohol Drug Res* 1987; 7: 423-41

## Tables

**Table 1:** Comparison of the cerebral weight among groups.

Group	Cerebral weight (g)		
	Maximum	Minimum	Mean $\pm$ standart deviation
IMS	1,2	1,0	1,0 $\pm$ 0,106
EMS	1,3	1,1	1,1 $\pm$ 0,104
NS	1,3	1,1	1,2 $\pm$ 0,078
IM	1,3	1,1	1,1 $\pm$ 0,075
EM	1,2	0,9	1,0 $\pm$ 0,091*
N	1,3	1,0	1,1 $\pm$ 0,106
Total	1,3	0,9	1,1 $\pm$ 0,107

OBS: The asterisk indicates statistically significant difference.

Groups: Intra-uterine malnutrition with seizure (IMS), extra-uterine malnutrition with seizure (EMS), adequate nutrition with seizure (NS), intra-uterine malnutrition without seizure (IM), extra-uterine malnutrition without seizure (EM) and nourished control (N).

**Table 2:** Seizure threshold comparison among groups with seizure.

<b>Group</b>	<b>Threshold in minutes (mean <math>\pm</math> sd)</b>
IMS	5,795 $\pm$ 1,827
EMS	2,916 $\pm$ 0,499*
NS	6,170 $\pm$ 0,918
Total	5,170 $\pm$ 1,832

OBS: The asterisk indicates statistically significant difference.

Groups: Intra-uterine malnutrition with seizure (IMS), extra-uterine malnutrition with seizure (EMS), adequate nutrition with seizure (NS), intra-uterine malnutrition without seizure (IM), extra-uterine malnutrition without seizure (EM) and nourished control (N).

**Table 3:** Cells number comparison in each hippocampus region.

<b>Group</b>		<b>CA1</b>	<b>CA2</b>	<b>CA3</b>	<b>CA4</b>	<b>GD</b>
<b>IMS</b>	<b>Max</b>	255771	4101	20070	3773	32621
	<b>Min</b>	19562	755	9402	1882	23962
	<b>Mean</b>	12650	2358	14610	2677	29322
	<b>Sd</b>	3962,3	1151,5	4003,5	726,9	3142,2
<b>EMS</b>	<b>Max</b>	28174	5888	21628	7624	36808
	<b>Min</b>	13081	2039	9644	3099	15854
	<b>Mean</b>	19320	3472	14040	5394	26487
	<b>Sd</b>	6158,7	1569,1	4325,0	1616,9	7545,2
<b>NS</b>	<b>Max</b>	30062	5130	31288	6536	45547
	<b>Min</b>	16020	2531	13940	1957	25196
	<b>Mean</b>	22328	3682	22267	4120	34717*
	<b>Sd</b>	5633,9	939,4	5916,0	1246,0	7571,9
<b>IM</b>	<b>Max</b>	22782	3011	16671	3418	31123
	<b>Min</b>	10249	874	7286	1229	20034
	<b>Mean</b>	14615	1370*	13858*	2591	24802
	<b>Sd</b>	3996,9	737,9	3228,4	795,7	3908,7
<b>EM</b>	<b>Max</b>	31060	7703	35762	4597	44569
	<b>Min</b>	11371	1325	3198	1597	22245
	<b>Mean</b>	20265	3930	17574	2806	32462
	<b>Sd</b>	6093,1	2467,7	8370,4	1019,9	7137,7
<b>N</b>	<b>Max</b>	23160	4856	25553	7572	29978
	<b>Min</b>	16295	2214	7934	2694	19221
	<b>Mean</b>	19491	3594	14558	4755	23951
	<b>Sd</b>	2311,8	895,7	6791,3	1510,4	4027,0

<b>Total</b>	<b>Max</b>	31060	7703	35762	7624	45547
	<b>Min</b>	10249	755	7286	1229	15854
	<b>Mean</b>	19426	3117	16466	3707	28923
	<b>Sd</b>	6941,4	5166,6	1616,5	6386,0	1550,2

OBS: The asterisk indicates statistically significant difference.

Groups: Intra-uterine malnutrition with seizure (IMS), extra-uterine malnutrition with seizure (EMS), adequate nutrition with seizure (NS), intra-uterine malnutrition without seizure (IM), extra-uterine malnutrition without seizure (EM) and nourished control (N).

## Figure legends

**Figure 1:** Anterior portion of the dorsal hippocampus of a rat (4x) divided in delineated regions: CA1 (pink), CA2 (green), CA3 (red), CA4 (blue) and dentate gyrus (yellow).

**Figure 2:** Daily body weight from P1 to P15 of the animals of the six groups in study: intra-uterine malnutrition with seizure (IMS), extra-uterine malnutrition with seizure (EMS), adequate nutrition with seizure (NS), intra-uterine malnutrition without seizure (IM), extra-uterine malnutrition without seizure (EM) and nourished control (N). The asterisks indicate statistically significant difference (see text for details).

**Figure 3:** (A) Representative photomicrograph of the dentate gyrus of a rat of the nourished control (N) group. (B) Representative photomicrograph of the dentate gyrus of a rat of the adequate nutrition with seizure group (NS), showing the visible difference in the cellular quantity.



Figure 1

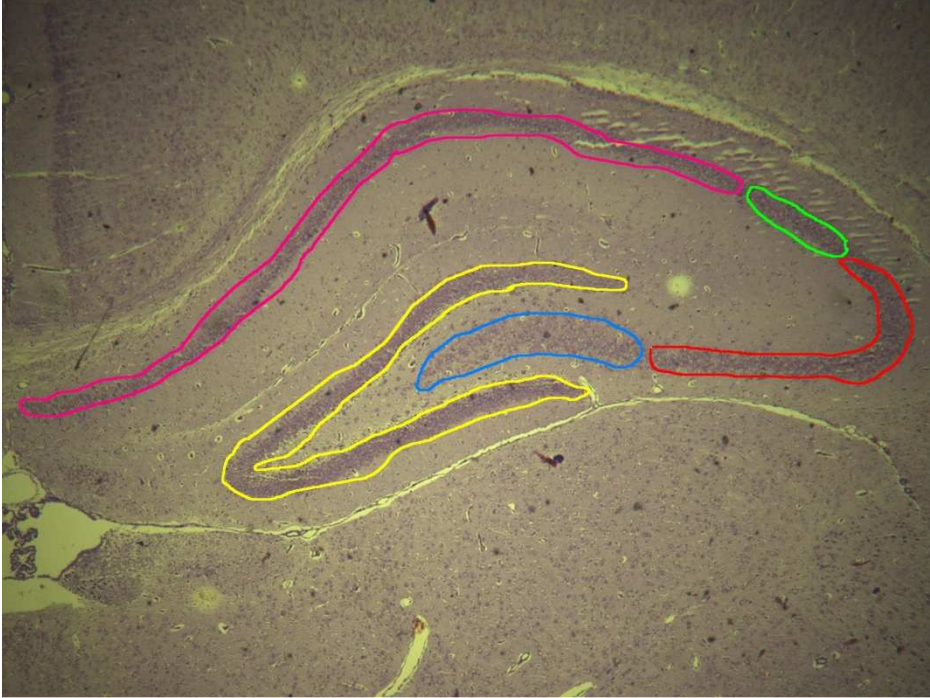
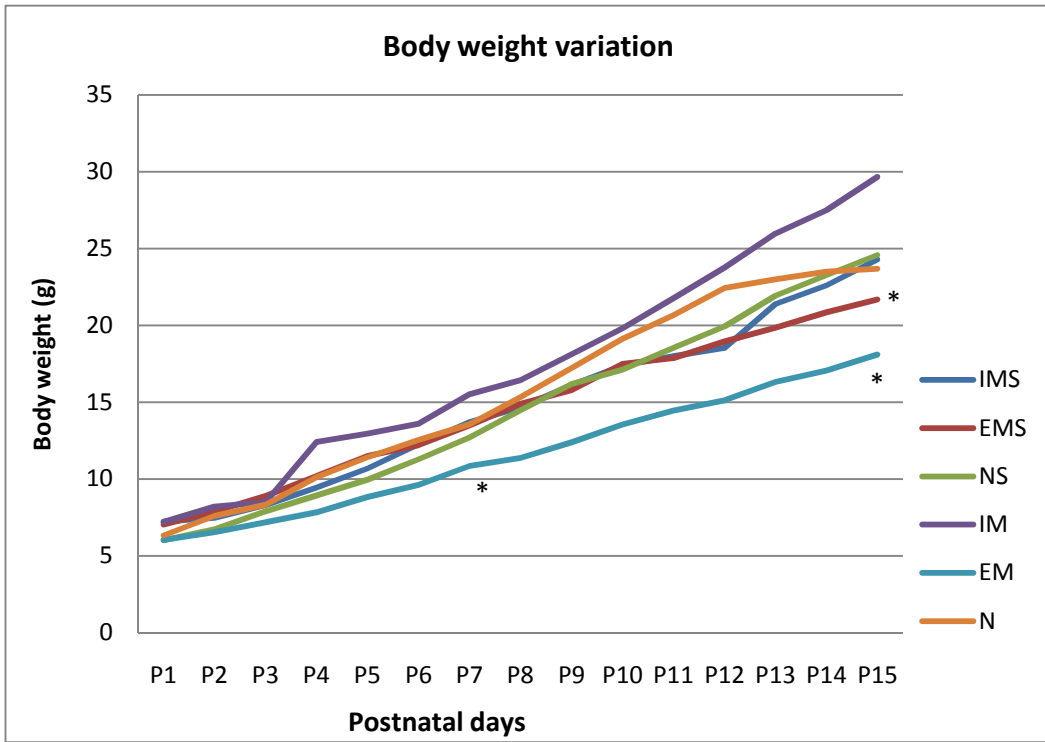
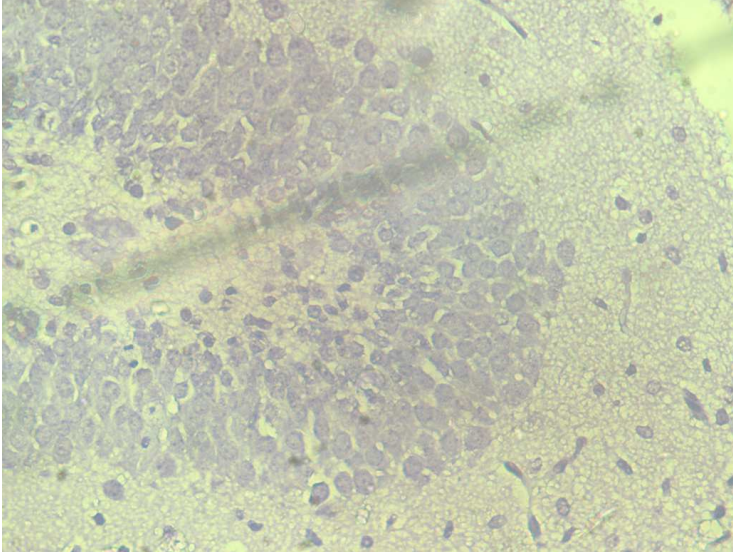


Figure 2



**Figure 3**

**A:**



**B:**

