Regina de Sousa Bolina-Matos

*Aspectos hístoquímicos e quantitativos
da renutrição precoce e tardia no
córtex cerebral de ratos Wistar*

São Paulo/2012

Regina de Sousa Bolina-Matos

**Aspectos histoquímicos e quantitativos da renutrição precoce e
tardia no córtex cerebral de ratos Wistar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2724
FMVZ

Bolina-Matos, Regina de Sousa
Aspectos histoquímicos e quantitativos da renutrição precoce e tardia no córtex cerebral de ratos
Wistar / Regina de Sousa Bolina-Matos. -- 2012.
177 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr Edson Aparecido Liberti.

1. Subnutrição. 2. Renutrição precoce e tardia. 3. Parte central do sistema nervoso. 4. Córtex cerebral.
5. Neurônios nitrérgicos I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aspectos histoquímicos, imunohistoquímicos e quantitativos da renutrição precoce e tardia no córtex cerebral de ratos Wistar", protocolado sob o nº 2170/2011, utilizando 42 (quarenta e dois) ratos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Histochemical immunohistochemical and quantitative aspects of the early and delayed renourishment in the cerebral cortex of wistar rats", protocol number 2170/2011, utilizing 42 (fourty two) rats, under the responsibility Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BOLINA-MATOS, Regina de Sousa

Título: Aspectos histoquímicos e quantitativos da renutrição precoce e tardia no córtex cerebral de ratos Wistar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

O homem deve saber que de nenhum outro lugar, mas apenas do encéfalo, vem a alegria, o prazer, o riso e a diversão, o pesar, o luto, o desalento e a lamentação. E por isso, de uma maneira especial, nós adquirimos sabedoria e conhecimento e enxergamos e ouvimos e sabemos o que é justo e injusto, o que é bom e o que é ruim, o que é doce e o que é insípido... E pelo mesmo órgão nos tornamos loucos e delirantes, medos e terrores nos assombram... Nesse sentido, opino que é o encéfalo quem exerce o maior poder sobre o homem.

Hipócrates (Sec. IV a.C)

Dedicatória

Há momentos em que somos tomados por uma enorme sensação de inutilidade, de vazio. Questionamos o porquê de nossa existência, porém nada parece fazer sentido. Concentramos nossa atenção no lado mais cruel da vida, aquele que é implacável e a todos afeta indistintamente, mas com certeza é a única certeza que temos. Então, vivemos em grande conflito - o mundo parece inadequado aos nossos olhos e aos nossos sonhos! Tantas pessoas maravilhosas vão...Quanta injustiça! Mas você veio aqui e cumpriu a sua missão. E que missão! Contaminou todos com este sorriso acolhedor, sincero e maduro. Ensinou-nos a amar e respeitar e, que pequenos atos e gestos substituem as palavras. Mas você foi, e deixou uma eterna saudade. E, às vezes nos perguntamos: De quem é a culpa? A culpa é da vida, que tem início, meio e fim. Mas o tempo é o único remédio e nele, conquistamos o consolo, com ele, recordamos os bons momentos e, transformamos aquela pessoa querida em uma eterna amiga. No fim, apenas a saudade e uma certeza: Não importa onde esteja, estará sempre conosco em nossos corações. Fique em PAZ, querida amiga Sílvia de Campos Boldrini!

AGRADEÇO ESPECIALMENTE...

A Deus

Sou grata ao Senhor por cada pessoa colocada nesse caminho durante este longo percurso e que, direta ou indiretamente, auxiliaram para a finalização desta etapa acadêmica. Agradeço-o ainda, por toda evolução científica adquirida durante esta etapa e peço forças para continuar a percorrer um longo caminho que ainda há pela frente, um caminho novo e cheio de obstáculos com certeza. Como és perfeito e maravilhoso, sei que o Senhor me escuta, mesmo quando estou em profundo silêncio e, sei que, também, reconhece a sinceridade dos meus votos de agradecimento.

Aos meus pais, Euclides e Paulina e às minhas irmãs, Daniela e Cristina

Agradeço pela formação do substrato existente em minha essência, sendo os maiores responsáveis, aqui na terra, por esta conquista. Agradeço também pelo enorme incentivo e pelos abraços afetuosos nos momentos de chegada e, também, nos momentos de partida e, até mesmo, pelos abraços por telefone, pois estes também foram sentidos. Porém, peço desculpas por minhas ausências e por minhas intolerâncias.

Cris, gostaria aqui de agradecer todo o companheirismo, a amizade, o incentivo e a ajuda, principalmente, com este trabalho. Saiba que te admiro enormemente. Desejo o melhor para você. Sempre!!!

Ao meu marido Paulo Henrique de Matos Alves

O que dizer para alguém que teve toda a paciência do mundo... Muito obrigada por tudo, por todas as oportunidades, por todas as palavras ditas e, também, por aquelas não ditas, e por todas as horas de trabalho comigo, com objetivo único de me ver feliz. Gostaria aqui de dizer que hoje, você é o meu chão. Te amo mais que tudo.

Ao grande amigo e orientador Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

Registro aqui meu respeito pela dor que o senhor sente, porém é preciso ter fé e coragem, até mesmo ser valente, pois apesar da saudade é preciso seguir em frente – precisamos muito do senhor. Gostaria ainda de agradecer pelos momentos no laboratório, pela diversão, pela boa conversa e, acima de tudo, pelo caráter e dignidade transmitidos, pelo respeito, pela compreensão e pelo amor de um pai. Obrigada por tudo, do fundo do coração e, principalmente, e pelos preciosos ensinamentos anatômicos. Finalmente, obrigada pela eterna amizade. Saberei agradecer sempre!

À toda Família Matos, especialmente, **Clêidina Matos, Cotegeipe Alves, Kerle Cristine, Valdete**, vocês são a minha família de escolha e, agradeço a Deus todos os dias por ter colocado vocês em minha vida, vocês são realmente muito importantes e apesar da distância, sempre estiveram muito presentes. Agradeço ainda pelo melhor presente que poderiam ter me dado – meu marido – Paulo Henrique.

Aos meus pequenos, **Yasmim, Giovanna, Luiz Filipe, Miguel e Ana Luiza**, vocês fazem toda a diferença na minha vida, enchendo-a de alegria.

Aos meus cunhados, **Rogério Galvão e Adriano Ciena**, obrigada pela amizade e aceitação, principalmente, naqueles momentos em que precisei de minhas irmãs e vocês cederam.

AGRADEÇO...

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, por proporcionar um desenvolvimento científico, profissional e pessoal.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo auxílio concedido.

À Professora Doutora **Maria Angélica Miglino**, pela oportunidade única, aceitando-me como aluna do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo, no qual desempenha importante papel de Coordenadora.

Aos mestres **Zenon Silva e César Natal**, obrigada pelo incentivo quanto à anatomia. Vocês jamais serão esquecidos.

Aos antigos companheiros do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e a Cirurgia - LAFACC, VQM. **Thelma Parada, Eduardo Beber, Dorival Martini, Willian Mayer, Carlos Eduardo Seyfert, Flávia de Oliveira, Flávio Tampelini, Josemberg Baptista, Bruna Cecília Caixeta, Sabrina Caixeta, Cibele Maciel, Aline Gonçalves, Diana Alves, Lucilene Ferreira, Ricardo Bandeira, Márcio Cristófar, Simone Piccoli, Thiago Habacuque, Marcelo Cavalli, Ricardo Fontes, Karina Marques, Leonardo Liberti**, pelos ensinamentos, pelos momentos de descontração por ocasião de algumas coletas e processamento de materiais tornando o trabalho menos árduo e por todos os dias da semana que passamos juntos durante todo o tempo destinado à realização desta dissertação. Agradeço, aqui, especialmente, as amigas **Lynda Tamayo, Valquíria Mariotti**, vocês são forte exemplo de dignidade e de superação.

Ao grande amigo **Ricardo Eustáquio**, agradeço, primeiramente, pela amizade, por todos os ensinamentos e pelos incentivos constantes. Você é um exemplo de dedicação, gentileza, educação, companheirismo e sabedoria. Muitas são as pessoas que passam por nossas vidas, porém, são poucas aquelas que deixam marcas profundas. “Amigo é coisa para se guardar do lado esquerdo do peito” e, acredite, você está lá.

Aos companheiros recentes, mas não menos importantes do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e a Cirurgia – LAFACC, VQM. **Jodonai Barbosa, Any Kelly Lima, Joice Bertaglia, Aline Marosti, Lidia Rocha, Naianne Clebis, Catarina Tivane, Josy Cal, Giovanna Campos, Natália Camargo, Ivone Benigno, Liliana Ribeiro**, da mesma forma, obrigada pelos ensinamentos e pela amizade. A convivência foi muito prazerosa. Muitos momentos ao lado de todos serão lembrados para sempre.

Às princesas, **Guilhermina e Wanda**, que alegram os nossos dias no laboratório. Acreditem, a rotina ficou menos árdua com a presença de vocês.

A Sra. **Rosana Duarte Prisco**, que com impressionante destreza domina a informação estatística sem hesitar. Foram horas a fio de discussões e ensinamentos “numéricos” que guardarei com bastante prazer na minha memória.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, **Fábio França e Renivaldo de Souza**, que, com paciência muito nos ensinaram sobre os animais experimentais.

À amiga **Malu Motta**, funcionária do ICB/USP, obrigada pela amizade e disponibilidade. Há, obrigada ainda pelos “cookies”.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Anatomia, **Sebastião Boleta, Sônia Regina Yokomizo e Marta Maria Righetti** pela paciência, dedicação e auxílio com as técnicas laboratoriais, sempre com grande disponibilidade.

Aos amigos considerados irmãos, **Poliana Sousa, Rogério Luiz Matos, o pequeno Rafael, Willer César de Freitas, Luciana Isquierdo, Roseâmely Angélica, Luciana Alves**, vocês contribuíram com muito carinho e amizade.

Aos **funcionários do ICB-USP e da FMVZ-USP**, especialmente o **Maicon Barbosa e Jaqueline Martins e a bibliotecária Elza**, pela consideração, atenção e respeito, durante o tempo dedicado a esta Universidade e pelas correções da tese.

Agradeço aos componentes da banca de qualificação desta tese. Professores Doutores **Edson Liberti, Flávia de Oliveira e Laura Maifrino** pela disponibilidade, os quais, naquele momento, contribuíram muito para a melhora deste estudo. Muito obrigada!

À **todos os amigos e colegas de pós-graduação**, não vou nominá-los por temor de uma omissão involuntária, porém agradeço por fazerem parte desta história.

À **todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, tão importante para minha vida profissional, o meu sincero agradecimento.**

RESUMO

BOLINA-MATOS, R. S. Aspectos histoquímicos e quantitativos da renutrição precoce e tardia no córtex cerebral de ratos Wistar. [Histochemical and quantitative aspects of early and late re-nourishment in the cerebral cortex of Wistar rats]. 2012. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar qualitativa e quantitativamente, através de técnicas histológicas e histoquímicas, o córtex cerebral de ratos submetidos a uma subnutrição protéica e posterior recuperação precoce e tardia. Foram utilizados ratos Wistar submetidos às seguintes dietas nutricionais: dieta padrão - normoprotéica - “AIN-93G”, contendo 20% de proteína (caseína) e dieta hipoprotéica - “AIN-93G”, – contendo 5% desta mesma proteína, durante os períodos experimentais de 42 e 60 dias. Os grupos experimentais foram formados por animais que desde o acasalamento até a eutanásia foram submetidos à dieta normoprotéica (grupos nutridos N42 e N60) e à dieta hipoprotéica (grupos subnutridos S42 e S60). O grupo renutrido precoce (Rp42) foi constituído por animais subnutridos que, a partir do 22º dia passaram a receber a dieta normoprotéica até 42 dias de idade; animais subnutridos que a partir do 43º dia receberam a dieta normoprotéica até 60 dias de idade, constituíram o grupo renutrido tardio (Rt60). Uma vez formado os grupos experimentais no momento do desmame (21 dias) todos os animais foram alojados e assistidos em gaiolas metabólicas. Características comportamentais e físicas foram avaliadas, bem como os seguintes aspectos morfométricos: pesos corporais e encefálicos; comprimento naso-anal, circunferência abdominal, índice de Lee (que avalia o grau de adiposidade) e as dimensões encefálicas. Para as avaliações quantitativas estruturais foram empregadas técnicas histológicas (H.E. e violeta Cresil) e histoquímica (β -Nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate – NADPH) para neurônios nitrérgicos. Foram avaliados parâmetros como: número de neurônios, densidade neuronal, área neuronal e o perfil da área dos neurônios corticais e nas camadas corticais. Em linhas gerais, para os parâmetros aqui avaliados, desde o nascimento até o sacrifício inerente a cada grupo experimental (42 e 60 dias), os animais dos grupos subnutridos (S42 e S60) apresentaram valores menores do que os respectivos grupos controle (N42 e N60), exceto no índice de Lee, significativamente maior do que nos animais nutridos. Os grupos renutridos, independentemente se precoce (Rp42) ou tardio (Rt60) conseguem alguma recuperação em

alguns parâmetros avaliados como peso encefálico, dimensões encefálicas e espessura cortical; porém outros como o peso corporal, e a área neuronal foram gravemente afetados. Todavia quando se observa a razão peso encefálico/peso corporal, os animais dos grupos subnutridos relativamente aos animais controles nutridos, apesar do peso corporal menor apresentam uma razão maior do que os respectivos controles, sugerindo ser o encéfalo menos afetado pela subnutrição do que o peso corporal. A subnutrição promoveu acentuada diminuição na área dos neurônios corticais e nitrérgicos, não recuperada com a renutrição, independentemente se precoce ou tardia. Portanto, conforme o proposto e com a metodologia utilizada no presente estudo pesquisa, os resultados permitem concluir que frente às condições de subnutrição, o organismo pode sofrer alterações irreparáveis dependendo do momento da vida em que ocorre, e que a renutrição pode promover recuperação ou mesmo adaptações em alguns parâmetros, preferencialmente se ocorrer em fases mais precoces.

Palavras-chave: Subnutrição, Renutrição precoce e tardia, Parte central do sistema nervoso, Córtex cerebral, Neurônios nitrérgicos

ABSTRACT

BOLINA-MATOS, R. S. Histochemical and quantitative aspects of early and late re-nourishment in the cerebral cortex of Wistar rats. [Aspectos histoquímicos e quantitativos da renutrição precoce e tardia no córtex cerebral de ratos Wistar]. 2012. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The objective of this study was to evaluate qualitative and quantitatively, through histological and histochemical techniques, the cerebral cortex of rats subjected to protein undernutrition subsequent to early and late recovery. Were used Wistar rats fed with standard (normal) diet- “AIN-93G” containing 20% of protein (casein), and hypoproteic diet- “AIN-93G” containing 5% of casein during experimental periods of 42 and 60 days. The experimental groups were performed by animals fed with normal diet from mating to euthanasia (nourished groups N42 and N60), and to hypoproteic diet (undernourished groups S42 and S60). The early re-nourished group (Rp42) was composed by undernourished animals fed with normal diet from 22nd day, whereas late re-nourished group (Rt60) was composed by undernourished animals fed with normal diet from 43rd to 60 days of age. Once established the experimental groups at weaning (21 days), all animals were housed and assisted in metabolic cages. Physical and behavioral characteristics were examined, as well as, morphometric aspects: body and brain weight; naso-anal length, abdominal circumference, Lee index (evaluation of fat deposit), and brain measures. For quantitative evaluation, histologic techniques (H.E. and Violet Cresyl), and Histochemistry (β -Nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate – NADPH) for nitrenergic neurons were performed. The number of neurons, neuronal density, neuronal area and profile of cortical neurons in cortical layers area were analyzed. Animals from S42 and S60 groups shown lower average compared to respective controls (N42 and N60), except in the Lee index, that was significantly higher than in nourished animals. Were observed that re-nourished groups either early (Rp42) or late (Rt60) have recovered in some parameters evaluated such as brain weight, brain measures and cortical thickness; however other parameters like body mass, and neuronal area was highly affected. Relatively to the proportion brain weight/body mass, animals from undernourished group although exhibit low body mass, shown higher proportion than respective control nourished, thus suggesting that brain is less affected by undernutrition than body mass.

The undernutrition promoted great decreasing of cortical and nitrergic neurons area; the area was not recovered by early and/or late re-nourishment. In the view of the objectives and methodology used in the present study, we can be conclude that in under-nutrition conditions the body can go through irreversible changes depending on period of occurrence; additionally, re-nourishment can promote recovery or adaptations in some parameters preferentially if occur in early phases.

Key-words: Undernutrition, Early and late re-nourishment, Central part of nervous system, Cerebral cortex, Nitrergic neurons.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Figura 1- Mapa da Fome	32
Figura 2 – Laminação cortical	37
Figura 3 – Esquema da proliferação celular	38
Figura 4 – Esquema da formação do córtex cerebral através do processo de migração celular	41
Figura 5 – Curvas de crescimento cerebral de sete espécies de mamíferos	41
Figura 6 – Representação esquemática dos neurônios corticais e de suas conexões	44
Figura 7 – Representação esquemática ilustrando as conexões neuronais corticocorticais	46
Figura 8 – Esquema da estrutura do córtex cerebral	47
Figura 9 –. Cromatólise em materiais corados pelo método de Nissl	51
Figura 10 – Composição das dietas experimentais	58
Figura 11 – Fotografia Gaiolas metabólicas	60
Figura 12 – Monitoramento dos animais nas gaiolas metabólicas	61
Figura 13 – Fluxograma do período experimental	63
Figura 14 – Esquema da obtenção dos espécimes utilizados	65
Figura 15 – Dimensões encefálicas do rato	67

Figura 16 – Secção coronal do encéfalo de um animal do grupo controle (N60) com delimitação da área cortical	69
Figura 17 – Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o <i>software</i>	70
Figura 18 – Campos de quantificação	71
Figura 19 – Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o <i>software</i>	72
Figura 20 – Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o sistema teste limitando a área para cálculo da densidade de volume dos neurônios corticais	73
Figura 21 – Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o <i>software</i>	75
Figura 22 – Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o <i>software</i>	75
Figura 23 – Comprimento dos animais dos grupos experimentais	81
Figura 24 – Encéfalos utilizados nos procedimentos experimentais	82
Figura 25 – Representação gráfica dos pesos corporais nos momentos do nascimento e do desmame	83
Figura 26 – Representação gráfica do peso corporal no momento da eutanásia	84
Figura 27 – Representação gráfica do peso encefálico e da razão <i>peso encefálico/peso corporal</i>	85
Figura 28 – Representação gráfica do comprimento naso-anal e da circunferência abdominal	87
Figura 29 – Representação gráfica do índice de Lee	88
Figura 30 – Representação gráfica dos eixos rostro-caudal, látero-lateral e dorso-ventral	89

Figura 31 – Representação gráfica das circunferências maior e menor do encéfalo	90
Figura 32 – Representação gráfica do peso corporal de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)	92
Figura 33 – Representação gráfica da ingestão alimentar de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)	93
Figura 34 – Representação gráfica da ingestão hídrica de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)	94
Figura 35 – Representação gráfica da excreção de fezes de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)	94
Figura 36 – Representação gráfica da excreção de urina de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)	95
Figura 37 – Representação gráfica da razão <i>ingestão alimentar/peso corporal</i> avaliada nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)	96
Figura 38 – Representação gráfica da razão <i>excreção de fezes/ingestão alimentar</i> avaliada nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)	97
Figura 39 – Representação gráfica da razão <i>ingestão hídrica/peso corporal</i> avaliada nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)	97
Figura 40 – Representação gráfica da razão <i>ingestão hídrica/ingestão alimentar</i> avaliada nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)	98
Figura 41 – Representação gráfica da razão <i>excreção de urina/ingestão hídrica</i> avaliada nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)	98
Figura 42 – Secção coronal do encéfalo de animal do grupo controle (N60)	99

Figura 43 – Caracterização da espessura cortical	100
Figura 44 – Aspecto geral da laminação do córtex cerebral em H.E	102
Figura 45 – Lâminas corticais em violeta cresil (Nissl)	103
Figura 46 – Constituintes típicos da lâmina piramidal interna	104
Figura 47 – Neurônios nitrérgicos de animal do grupo N60	104
Figura 48 – Representação gráfica da espessura cortical	105
Figura 49 – Representação gráfica do nº de neurônios corticais por unidade de área	106
Figura 50 – Representação gráfica do nº de neurônios corticais por unidade de área relativas às lâminas corticais	107
Figura 51 – Representação gráfica do V_v dos neurônios corticais	108
Figura 52 – Representação gráfica do V_v dos neurônios corticais relativos às lâminas corticais	109
Figura 53 – Representação gráfica da área dos neurônios corticais	110
Figura 54 – Representação gráfica da área dos neurônios corticais relativos às lâminas corticais	111
Figura 55 – Aspecto neuronal das lâminas corticais dos animais de 42 dias (N42, S42 e Rp42)	112
Figura 56 – Aspecto neuronal das lâminas corticais dos animais de 60 dias (N60, S60 e Rt60)	113
Figura 57 – Representação gráfica da distribuição da área dos neurônios corticais relativos à lâmina granular	114
Figura 58 – Representação gráfica da distribuição da área dos neurônios corticais relativos à lâmina piramidal externa.....	115

Figura 59 – Representação gráfica da distribuição da área dos neurônios corticais relativos à lâmina piramidal interna.....	116
Figura 60 – Representação gráfica da distribuição da área dos neurônios corticais relativos à lâmina multiforme.....	117
Figura 61 – Representação gráfica da área dos neurônios nitrérgicos corticais	118
Figura 62 – Neurônios nitrérgicos	119
Figura 63 – Representação gráfica da distribuição da área do perfil dos neurônios nitrérgicos corticais	120

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Média ($\pm$ DP) dos pesos corporais (g) obtidos nos períodos do nascimento e do desmame dos animais dos grupos básicos nutridos (N) e subnutridos (S) - São Paulo - 2009 a Jun. **83**
- Tabela 2 – Média ($\pm$ DP) dos pesos corporais (g) no momento da eutanásia, os pesos encefálicos (g) e a razão *peso encefálico/peso corporal* dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012. **84**
- Tabela 3 – Média ($\pm$ DP) do comprimento naso-anal (cm) e da circunferência abdominal (cm) no momento da eutanásia dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012. **86**
- Tabela 4 – Média ($\pm$ DP) do índice de Lee dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012. **88**
- Tabela 5 – Média ($\pm$ DP) dos dados referentes às dimensões encefálicas relativas aos eixos rostro-caudal (cm), látero-lateral (cm), dorso-ventral (cm) e circunferências encefálicas maior (cm) e menor (cm) dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012. **89**
- Tabela 6 – Média ($\pm$ DP) dos pesos corporais (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Novembro de 2012. **92**
- Tabela 7 – Média ($\pm$ DP) da ingestão alimentar (g) e hídrica (ml) e da excreção de fezes (g) e urina (ml), de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Novembro de 2012. **93**
- Tabela 8 – Média ($\pm$ DP) razão entre: *ingestão alimentar/peso corporal*; *excreção de fezes/ingestão alimentar*; *ingestão hídrica/peso corporal*; *ingestão hídrica/ingestão alimentar*; *excreção de urina/ingestão hídrica* relativa às avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Novembro de 2012. **95**
- Tabela 9 – Média ($\pm$ DP) dos dados referentes à espessura cortical (μ m) dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012. **105**

Tabela 10 – Média ($\pm$ DP) dos dados referentes ao número de neurônios por unidade de área dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.	106
Tabela 11 – Média ($\pm$ DP) dos dados referentes à densidade de volume (%) dos neurônios dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.	108
Tabela 12 – Média ($\pm$ DP) dos dados referentes a área (μm^2) dos neurônios dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.	109
Tabela 13 – Média ($\pm$ DP) dos dados referentes a área (μm^2) dos neurônios nitrérgicos corticais dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.	118

LISTA DE ABREVIATURAS

a.n = área dos neurônios nitrérgicos
a.c = área dos neurônios corticais
r/c = eixo rostro-caudal
c-a = circunferência abdominal
cema = circunferência encefálica maior
ceme = circunferência encefálica menor
d/v = eixo dorso-ventral
e.c = espessura cortical
iL = índice de Lee
IMC = índice de massa corporal
l/l = eixo látero-lateral
N = animal do grupo básico nutrido (controle)
n/a = número de neurônios/área
N42 = grupo nutrido até 42 dias de idade
N60 = grupo nutrido até 60 dias de idade
n-a = comprimento naso-anal
NADPH-d = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase
NBT = *Nitroblue tetrazolium*
Pd = peso corporal obtidos no período do desmame
Pe = peso encefálico
Pn = peso corporal no período do nascimento
Pet = peso corporal no período da eutanásia
R = animal ou grupo renutrido
Rp42 = grupo renutrido precoce
Rt60 = grupo renutrido tardio
S = animal do grupo básico subnutrido
S42 = grupo subnutrido até 42 dias de idade
S60 = grupo subnutrido até 60 dias de idade
 V_v = densidade de volume dos neurônios
ZtD = processo zigomático do osso temporal direito
ZtE = processo zigomático do osso temporal esquerdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Terminologia	28
2.2 Tipos de subnutrição	29
2.3 A subnutrição e o sistema nervoso	30
2.4 Efeitos da Renutrição no Sistema Nervoso em Geral	34
2.5 O córtex cerebral	36
2.5.1 <i>Desenvolvimento do córtex cerebral</i>	37
2.5.2 <i>Gênese neuronal do córtex cerebral</i>	38
2.5.3 <i>Estratigrafia do córtex cerebral</i>	42
2.5.4 <i>Elementos constitutivos do córtex cerebral</i>	44
2.5.5 <i>Áreas do córtex cerebral</i>	47
2.6 Coloração de Nissl através da solução da violeta cresil	49
2.7 Avaliação e classificação da composição corporal através do Índice de Lee e da circunferência abdominal	51
2.8 Óxido nítrico e o sistema nervoso	53
3 OBJETIVOS	54
3.1 Objetivos gerais	55
3.2 Objetivos específicos	55
4 MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1 Acasalamento, gestação e obtenção das ninhadas	57
4.2 Formação dos grupos experimentais	62
4.2.1 <i>Grupos de 42 dias: N42, S42 e Rp42</i>	62
4.2.2 <i>Grupos de 60 dias: N60, S60 e Rt60</i>	62
4.3 Eutanásia	64
4.4 Obtenção dos encéfalos	64
4.5 Avaliações macroscópicas qualitativas	65
4.6 Avaliações macroscópicas quantitativas	66
4.6.1 <i>Corporal</i>	66
4.6.2 <i>Encefálico</i>	66

4.7 Avaliações microscópicas	67
<i>4.7.1 Evidenciação dos neurônios corticais através dos métodos da hematoxilina e eosina, e violeta cresil (Nissl)</i>	<i>67</i>
<i>4.7.2 Marcação dos neurônios corticais nitrérgicos através da reação histoquímica da β-Nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d)</i>	<i>68</i>
4.7.3 Métodos histomorfométricos	69
<i>4.7.3.1 Determinação da espessura do córtex cerebral (e.c)</i>	<i>70</i>
<i>4.7.3.2 Determinação do <u>número de neurônios (n/a)</u>, da <u>densidade de volume neuronal (V_v)</u> e da <u>área dos perfil celular dos corpos neuronais corticais (a.c)</u></i>	<i>71</i>
<i>4.7.3.2.1 Número de neurônios corticais por unidade de área (n/a)</i>	<i>72</i>
<i>4.7.3.2.2 Densidade de volume dos neurônios corticais (V_v)</i>	<i>73</i>
<i>4.7.3.2.3 Área do perfil celular dos corpos neuronais corticais (a.c)</i>	<i>74</i>
<i>4.7.3.3 Determinação da <u>área dos perfil celular dos corpos neuronais nitrérgicos (a.n)</u></i>	<i>74</i>
4.8 Tratamento estatístico	76
5 RESULTADOS	77
5.1 Aspectos macroscópicos	78
5.1.1 Aspectos macroscópicos qualitativos	78
5.1.2 Aspectos macroscópicos quantitativos	83
<i>5.1.2.1 Pesos: corporal e encefálico</i>	<i>83</i>
<i>5.1.2.2 Comprimento naso-anal (n-a) e circunferência abdominal(c-a)</i>	<i>86</i>
<i>5.1.2.3 Determinação do grau de adiposidade corporal: índice de Lee (iL)</i>	<i>87</i>
<i>5.1.2.4 Dimensões encefálicas</i>	<i>89</i>
<i>5.1.2.5 Avaliações metabólicas</i>	<i>91</i>
5.2 Aspectos histológicos	99
<i>5.2.1 Aspectos histológicos qualitativos</i>	<i>99</i>
<i>5.2.2 Aspectos histológicos quantitativos</i>	<i>105</i>
6 DISCUSSÃO	121
6.1 Considerações sobre o modelo animal e experimental	122
6.2 Considerações morfológicas macroscópicas	127
6.3 Considerações metabólicas	134
6.4 Considerações morfológicas microscópicas	138
CONCLUSÕES	149
REFERÊNCIAS	153
ANEXOS	174

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A fome e a subnutrição permanecem entre as mais relevantes consequências da pobreza mundial, principalmente em países em desenvolvimento onde crianças, adolescentes e idosos sofrem de pelo menos um tipo de subnutrição. Aproximadamente 43% das crianças em países em desenvolvimento sofrerá subnutrição em algum momento da vida. Estima-se que, mais de um terço das crianças menores que 5 anos de idade sofrem de subnutrição grave ou moderada, sendo que destas, 80% são asiáticas, 15% são africanas e 5% são latino-americanas. (FAO, 2006). Assim, a subnutrição é uma das doenças que mais mata crianças abaixo dos 5 anos de idade (SAWAYA, 2006).

Particularmente, o Brasil pertence ao grupo de 42 países do mundo que respondem por 90% das mortes decorrentes de algum tipo de subnutrição (AMARAL et al., 2005). A subnutrição na infância, que se caracteriza pelo baixo peso corporal, atraso no crescimento e no desenvolvimento cognitivo, vulnerabilidade a doenças infecciosas e crônicas como *diabetes mellitus*, síndrome metabólica na vida adulta, hipertensão e doenças cardiovasculares, continua sendo um problema grave nas regiões norte e nordeste (BARKER et al, 1993; BATISTA-FILHO; RISSIN, 2003).

Durante o desenvolvimento de um órgão, principalmente naquela fase de intensa proliferação celular, seus tecidos encontram-se sensíveis a injúrias decorrentes de fatores extrínsecos que podem atuar na gestação. Dentre esses fatores, a subnutrição é aquele que, dependendo do momento em que ocorre, sua duração e intensidade, pode causar efeitos nocivos, principalmente em tecidos que estejam em fase de desenvolvimento acelerado (MORGANE et al., 2002).

Os efeitos da subnutrição no sistema nervoso são muito mais severos quando ela coincide com uma importante fase, conhecida como “período de crescimento rápido do cérebro”. Entretanto, esta denominação não está simplesmente relacionada com o rápido aumento do peso cerebral, mas sim, com vários períodos onde eventos como proliferação celular (neurogênese e gliogênese), migração e diferenciação neuronal atingem a velocidade máxima em cada região cerebral (MORGANE et al., 1993). Desta forma, por ser uma fase na qual o encéfalo se encontra mais vulnerável às agressões, inclusive às carências nutricionais, esta também pode ser denominada de “período crítico do desenvolvimento”, que em humanos inicia-se no último trimestre de gestação e continua até, aproximadamente, o segundo ano de vida, ou seja, pré e pós-natal. Em animais como o rato, este período corresponde às três

primeiras semanas após o nascimento, ou seja, pós-natal (DOBBING, 1972). Assim, em ratos, estruturas encefálicas que se desenvolvem após o nascimento, como é o caso do cérebro, do hipocampo e do cerebelo, estão mais susceptíveis às alterações que podem persistir por toda a vida (LEVITSKY; STRUPP, 1995).

Trabalhos experimentais mostram que a privação nutricional, durante os períodos críticos de desenvolvimento cerebral, promove alterações importantes em parâmetros como: redução dos pesos corporal e encefálico (CORDERO et al., 1986; DÍAZ-CINTRA et al., 1990; TEODÓSIO et al., 1990; FERNÁNDEZ et al., 1993; MONTEIRO, 1995); redução do volume (MORGANE, 1978; BEDI; BHIDE, 1988) e da espessura do córtex cerebral (DOBBING et al., 1971; CRAGG, 1972; YAMANO et al., 1980; NOBACK; EISENMAN, 2005); aumento do número de espinhas dendríticas em neurônios piramidais do córtex visual (DÍAZ-CINTRA et al., 1990); redução no tamanho do corpo celular e volume da árvore dendrítica de células piramidais do córtex cerebral (CORDERO et al., 1986); redução da espessura dos processos dendríticos, do número e da densidade de espinhas dendríticas no córtex frontal e occipital (SALAS et al., 1974); e aumento da densidade de espinhas dendríticas no corpo estriado e no córtex entorrinal de ratos (BROCK; PRASAD, 1992).

Considerando-se que muitos dos estudos sobre subnutrição têm se desenvolvido com o intuito de se entender como o desenvolvimento do encéfalo é afetado, poucos avaliam seus efeitos sobre a ótica da reabilitação (ZAMENHOF et al., 1972; ÂNGULO-COLMENARES, 1979; PICANÇO-DINIZ et al., 1998; SOTO-MAYANO et al., 1999; BORBA et al., 2000; CORDERO, 2003). Considerou-se na presente pesquisa o período de 42 dias, juntamente ao de 60 dias, como período a ser avaliado, uma vez que esses períodos foram suficientes para promover alterações importantes, principalmente nos animais subnutridos (OLIVEIRA, 2006; BAPTISTA, 2008; HABACUQUE, 2010; LUIZ, 2012).

Tal justificativa procede, uma vez que, poucos estudos determinam a presença de neurônios que expressam os mais diferentes tipos de neurotransmissores avaliados sob o aspecto da renutrição, independentemente se precoce ou tardia.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo dedica-se à descrição da literatura pertinente sobre o tema aqui apresentado, a qual forneceu aspectos de relevância e suporte científico para a condução deste estudo e está subdividida em tópicos como se segue:

2.1 Terminologia

O termo desnutrição pode compreender diferentes significados. Para Ferreira (2010), autor de um dos dicionários mais utilizados no Brasil, o **Aurélio**, conceitua o termo “desnutrição” como nutrição insuficiente, ou nula. Relativamente ao termo “subnutrição”, este é caracterizado como estado de uma pessoa insuficientemente nutrida, o qual quando prolongado, pode comprometer a saúde ou, inclusive, provocar a morte. O termo “malnutrido” significa aquele que não se nutriu devidamente, cuja alimentação foi (ou é) fraca em termos nutricionais.

A FAO (2006) define desnutrição como ingestão de alimentos insuficiente e prolongada, associada à baixa absorção dos alimentos consumidos e é aplicada às deficiências calóricas, protéicas ou calórico-protéicas. Já o termo subnutrição, é definido como quantidade insuficiente de nutrientes do que aquela mínima necessária para manter o peso corporal constante.

Na literatura que se teve acesso, percebe-se que não existe um consenso a cerca da nomenclatura relacionados às alterações do estado nutricional. Para Morgane et al. (2002), o termo subnutrição (*undernutrition*) está associado a uma desnutrição energética, onde há deficiência global de nutrientes. Entretanto, o termo má nutrição (*malnutrition*) indica proporções desequilibradas de um ou mais nutrientes, compreendendo a sua deficiência ou seu excesso. Para Monteiro (1995), etimologicamente, o termo desnutrição engloba todos os estados determinados por deficiência quantitativa (energia) e/ou qualitativa (um ou mais nutrientes), assim como, o consumo alimentar excessivo e, ainda, há certas doenças metabólicas que podem caracterizar desvio de nutrição normal.

Reconhece que, a nomenclatura clínica produziu uma grande variedade de sinónimas que torna difícil estabelecer o que se pretende valorizar conceitualmente, com a escolha de

determinados termos, criando assim, sérios obstáculos à linguagem. Possivelmente, não há uma síndrome com mais rica sinonímia do que a subnutrição, sendo possível agrupar diversos termos como: síndrome discrônica edematosa, despigmentação, edema nutricional, síndrome subnutricional aguda, criança vermelha, *kwashiorkor*, pelagra infantil, edema infantil, má nutrição maligna, doença gordurosa do fígado, distrofia nutricional, edema de amido, edema de fome, atrofia pancreática com fígado gorduroso, caquexia edematosa, desnutrição de 3º grau, distrofia pluricarencial hidropigênica, marasmo do desmame, distrofia, atrofia, atrepsia, caquexia, marasmo, decomposição, etc. (NÓBREGA, 1986). Para Chandra (1992), a subnutrição é uma síndrome complexa, onde diversas deficiências ocorrem simultaneamente. Desta forma, optou-se aqui, pela utilização o termo subnutrição para designar uma deficiência protéica.

2.2 Tipos de subnutrição

A subnutrição está associado diretamente à indivíduos de baixa renda, à população pobre e, principalmente, em crianças de países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil e, que vivem em zonas rurais e peri-urbanas (MONTEIRO, 2002). Dentre os fatores que podem desencadear a subnutrição, destacam-se as causas primárias como as dietas desbalanceadas (alimentação quantitativa ou qualitativamente insuficiente em calorias e nutrientes), e secundárias como situações em que há insuficiente ingestão de alimentos por aumento das necessidades energéticas, por má absorção dos nutrientes pelo intestino ou perda excessiva de nutrientes provocada por alguma patologia (MONTEIRO, 1979; WHO, 2005).

A desnutrição energético-protéica (DEP) é uma síndrome a qual é caracterizada pela existência de um desequilíbrio celular entre o fornecimento de nutrientes e energia e a demanda corporal para garantir o crescimento e a manutenção de funções específicas vitais (JAHOOOR et al., 2008).

A desnutrição protéica-calórica (DPC) pode ocorrer por três tipos: DPC seca, o qual o indivíduo apresenta-se magro e desidratado, enquanto a DPC molhada, é também conhecida por *Kwashiorkor*, onde o indivíduo mostra-se “inchado” por causa de retenção hídrica e a DPC intermediária, a qual é conhecida como marasmo e é oriunda de um quadro típico de “fome” (NÓBREGA, 1986).

Kwashiorkor é originado de um dos dialetos de Gana, país da África, e significa "mal do 1º filho, quando nasce o segundo" ou "aquele que foi deixado de lado" indicando que a criança mais velha foi desmamada precocemente, assim que seu irmão mais novo nasceu (NÓBREGA, 1986).

Cientificamente, demonstrou-se que a deficiência de proteína nos casos de *kwashiorkor* é, normalmente, mais significativa que a deficiência calórica, ocasionado pela redução das proteínas plasmáticas, reduzindo, assim, a pressão coloidosmótica e, conseqüentemente, o fluxo osmótico através das paredes dos capilares resultando em retenção de fluidos que se traduz em edema generalizado, acompanhado de doença da pele e descoloração do cabelo (VINCENT; RADERMECKER, 1959; NÓBREGA, 1986).

Nos indivíduos subnutridos, e de modo mais evidente no marasmático, observa-se uma redução das massas musculares como parte do quadro de adelgaçamento dos membros e da redução da camada muscular, que se associa à redução na espessura do panículo adiposo (NÓBREGA, 1986). O indivíduo marasmático ingere pouco alimento e, pelo seu grau de debilidade invariavelmente está exposto a qualquer tipo de infecção.

Entre o *Kwashiorkor* e o marasmo, existe um tipo de DPC denominado *Kwashiorkor-marasmático*, onde os indivíduos retêm algum fluido e possuem mais gordura corporal do que naqueles puramente marasmáticos (RACELA et al., 1966; JAHOOOR et al., 2008).

Segundo Jahoor et al. (2008), o *Kwashiorkor* é menos comum do que o marasmo e normalmente acontece como *Kwashiorkor-marasmático*, sendo que esta deficiência proteica prejudica o crescimento corporal, a imunidade, a cicatrização e a produção de enzimas e hormônios. Contudo, a recuperação da criança é mais rápida no marasmo do que no *kwashiorkor*.

2.3 A subnutrição e o sistema nervoso

A subnutrição é avaliada como doença decorrente de uma dieta alimentar inadequada, estando associada a diversos fatores como a fome, a pobreza, os processos infecciosos, a baixa ingestão calórica e protéica, trazendo conseqüências desastrosas para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência de crianças (MONTEIRO, 1995; MONTE, 2000).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1997), classificou a subnutrição como um quadro de carência protéico-calórica, apresentando-se sob duas formas graves: o marasmo,

decorrente de uma deficiência energética e o *Kwashiorkor*, da deficiência protéica (NEWSHOLME; LEECH, 1984).

No Brasil, apesar dos dados epidemiológicos dos últimos anos mostrarem redução nos quadros de subnutrição, ainda hoje a subnutrição é classificada como um dos mais preocupantes problemas de saúde pública, sendo responsável por 55% das mortes de crianças no mundo inteiro. Todavia, o mapa da fome, publicado pela WFP (2012) - *World Food Programme*, mostra aumento dos índices (5 a 14%) de subnutrição no Brasil quando comparado à última publicação, onde este índice era de apenas 5 a 9% (WFP, 2011), (Figura 1). Desta forma, para Bittencourt et al. (2009), a subnutrição ainda continua sendo importante nas estatísticas de morbidade e mortalidade no país.

De um modo geral, em países em desenvolvimento, a subnutrição gestacional tem prevalecido sob a subnutrição pós-natal, e esta primeira, está diretamente associada ao retardo cognitivo (HALL et al., 2001), e nestes períodos os efeitos são mais severos e irreversíveis (JOSHI et al., 2003).

Nos últimos anos, os efeitos adversos da subnutrição materna sobre o crescimento fetal e neonatal e suas repercussões na vida adulta, têm despertado interesse na comunidade científica. Desai et al. (1996) sugere que uma deficiência nutricional durante o período de desenvolvimento crítico, acarreta em efeitos duradouros e persistentes ao longo da vida de um indivíduo, levando a um retardo de crescimento generalizado e a redução permanente do tamanho de órgãos e tecidos.

A maturação e o desenvolvimento do sistema nervoso dependem, essencialmente, do potencial genético do indivíduo, do estímulo ambiental e de uma nutrição adequada (MORGANE et al., 1993). Fatores exógenos, como a subnutrição, podem causar alterações no crescimento ordenado e na elaboração de circuitos neuronais (MORGANE et al., 2002).

O período de crescimento rápido e de desenvolvimento do encéfalo ocorre nas fases iniciais da vida pós-natal (SMART; DOBBING, 1971), sendo que nesta fase, devido ao rápido processo de hiperplasia, hipertrofia, mielinização e migração neuronal, o encéfalo torna-se mais vulnerável às alterações nutricionais (DOBBING, 1972). Por outro lado Cameron e Mckay (2001) relatam que há formação de novas células no sistema nervoso durante toda a vida, pelo menos em algumas regiões cerebrais. Petry, Ozanne e Hales (2001) sugeriram que durante os períodos críticos de desenvolvimento do encéfalo, há uma adaptação e/ou programação metabólica que se caracteriza pela redistribuição do fluxo sanguíneo fetal para este órgão, como forma de preservá-lo em detrimento dos demais.

Figura 1- Mapa da Fome

Fonte: (WFP, 2011; 2012)

Legenda: Observar o aumento dos índices de subnutrição no Brasil de 2011 (A) para 2012 (B).

Particularmente no sistema nervoso, os efeitos da subnutrição têm sido avaliados nas diferentes partes. Assim, na parte periférica (SNP), Matheson (1970); Hedley-Whyte e Meuser (1971) demonstraram alterações no desenvolvimento da bainha de mielina do nervo isquiático de ratos e Vargas et al. (1997), observaram uma redução de 50% nas voltas da bainha de mielina do mesmo nervo. Oldfors (1981) detectou degeneração na parte distal de nervos espinais de ratos. Wiggins et al. (1984) encontraram uma redução significativa no número de fibras mielínicas do nervo óptico de ratos. Cornblath e Brown (1988) verificaram uma diminuição de fibras de grande diâmetro no nervo tibial posterior de ratos e Rana et al. (1991) desmielinização segmentar nos nervos tibial e ulnar de macacos jovens.

Em nervos cranianos, Sima e Sourander (1974a) verificaram uma redução irreversível no diâmetro das fibras do nervo óptico e Conradi et al. (1989), no mesmo nervo, relataram uma redução na área de secção transversa, bem como do número total de fibras mielínicas. Recentemente, Simões et al. (2008) detectaram uma diminuição da área do corpo celular neuronal, no gânglio trigeminal de ratos jovens desnutridos.

Na divisão Autônoma do Sistema Nervoso (SNA), a diminuição do número de lamelas das fibras nervosas mielínicas foi observada por Schäfer e Friede (1988) em nervos autônomos de ratos. Em gânglios simpáticos, como o cervical superior, foi observado um decréscimo significativo no conteúdo protéico ganglionar principalmente nas enzimas sintetizadoras dos neurotransmissores (GAETANI et al., 1977). Segundo Santer e Conboy (1988), o número de neurônios do plexo mioentérico diminuiu cerca de 27% no intestino delgado de ratos. Uma diminuição significativa desses neurônios (aproximadamente, 33%) também foi determinada por Gomes et al. (2006) no intestino delgado de ratos e, por Liberti et al. (2007), no esôfago de ratos (aproximadamente, 30%); particularmente para essa órgão, os autores determinaram uma diminuição de cerca de 50% no número de neurônio nitrérgicos, quando comparado ao grupo controle. Habacuque (2010) observou que a subnutrição protéica alterou o desenvolvimento dos animais e dos componentes do plexo traqueal de ratos Wistar.

Estudos realizados em diversas épocas vêm demonstrando um efeito deletério na parte Central do Sistema Nervoso (SNC). Reduções significativas têm sido detectadas, muitas vezes permanentes no peso encefálico (WINICK, 1969; HEDLEY-WHYTE; MEUSER, 1971; BEDI; WARREN, 1983; CORDERO et al., 1986, TATLI, 2007) e na espessura do córtex cerebral (ZAMENHOFF et al., 1971; CLARK et al., 1973; YAMANO et al., 1980; NOBACK; EISENMAN, 2005). A subnutrição causou alterações na morfologia das células hipocâmpais (DIAZ-CINTRA et al., 1994), no número e na distribuição de

neurotransmissores (FIACCO et al., 2003) e no desempenho de tarefas comportamentais envolvendo o hipocampo (TONKISS; GALLER, 1990; TONKISS et al., 1993).

Ainda foram observadas, reduções significativas na neurogênese do cerebelo (WALLINGFORD et al., 1980) e na formação do hipocampo (MORGANE, 2002); no conteúdo de DNA do tecido cerebral (FISH; WINICK, 1969) e no grau de mielinização do encéfalo (WIGGINS, 1982; DAVISON; DOBBING, 1966; WINICK, 1969). Além disso, foram observadas perdas de terminações nervosas de axônios do córtex (EAYRS; HORN, 1955); redução no tamanho do corpo celular e volume da árvore dendrítica de células piramidais do córtex occipital (CORDERO et al., 1986) e diminuição do número de neurônios do córtex cerebral, da medula espinal e do giro denteado (SHRADER; ZEMAN, 1969; BEDI, 1994; LISTER et al., 2005). Pesquisas, utilizando-se ratos, observaram uma diminuição do fator neurotrófico (BDNF) no sistema nervoso cerebral, principalmente no hipocampo e no córtex (WANG; XU, 2007) e da enzima catalase no córtex cerebral e cerebelo (BONATTO, 2006), estas podem ser correlacionados com o *déficit* no desempenho do aprendizado e da memória.

2.4 Efeitos da Renutrição no Sistema Nervoso em Geral

Após renutrição realizada durante a segunda metade do período de aleitamento, Hedley-Whyte (1973) observou que os efeitos da subnutrição, durante a primeira metade do período de aleitamento sobre a mielinização, podem ser revertidos completamente. Por outro lado, quando a subnutrição se estende por todo o período de aleitamento, os efeitos sobre a mielinização são revertidos somente de forma parcial, através de uma renutrição promovida até os 46 dias de idade. Ultraestruturalmente, notou-se que a subnutrição causou um atraso na mielinização do nervo óptico e das fibras nervosas das raízes anterior e posterior do quinto nervo lombar. Com a renutrição, houve recuperação total do nervo óptico e parcial da raiz anterior do nervo lombar, que teve a estrutura de sua raiz posterior irreversivelmente alterada. (SIMA, 1974 a,b).

Sima e Sourander (1974b), ao avaliarem o diâmetro das fibras mielínicas do nervo óptico de ratos subnutridos, nos períodos pré e pós-natal e renutridos do vigésimo dia até 180 dias de idade, observaram uma redução na bainha de mielina. Bedi e Warren (1983), também avaliando nervos ópticos de ratos, detectaram *déficit* quanto ao número de fibras em animais

subnutridos, o que não foi permanente, uma vez que, aos 200 dias de idade, os nervos dos animais renutridos exibiam o mesmo aspecto dos animais controle, relativamente ao número de fibras. Esse mesmo tipo de renutrição foi descrito por Wiggins et al. (1976; 1984) no nervo óptico de ratos renutridos desde o 21º ao 63º dia de idade.

Gopinath et al. (1983) descreveram, com a renutrição, a persistência de um retardo no desenvolvimento das fibras nervosas do nervo ciático de ratos, o que não foi confirmado por Rana et al. (1991) que, ao estudarem os nervos ulnar e tibial de macacos jovens submetidos à subnutrição protéica pós-natal e subsequente renutrição, verificaram que as alterações histopatológicas presentes nos animais subnutridos desapareceram após o processo de renutrição.

No plexo mioentérico do intestino grosso de ratos subnutridos, o processo de recuperação protéica (renutrição) permitiu que se estabelecesse a área média do corpo celular dos neurônios (CASTELUCCI et al., 2002), e no intestino delgado, a renutrição permitiu a recuperação do número estimado de neurônios mioentéricos, bem como, da reatividade à acetilcolinesterase e, da imunoreatividade à acetiltransferase (GOMES et al., 2006).

Avaliando os efeitos da renutrição em encéfalos de ratos que, submetidos à subnutrição protéica, exibiram uma diminuição nas dimensões encefálicas, Angulo-Colmenares (1979) observou uma recuperação das diferentes medidas, compatíveis com valores considerados normais. Para Cordero (2003), que detectou com a renutrição, uma recuperação da camada piramidal do córtex occipital relativamente ao tamanho e orientação dos neurônios, inferiu que, quanto maior o tempo de subnutrição, mais graves são os efeitos e, mais difícil uma recuperação da orientação e do tamanho dos neurônios piramidais no neocórtex, mesmo sendo, esta reabilitação, até a idade adulta (120 dias).

De acordo com Picanço-Diniz et al. (1998), o volume neuronal do córtex cerebral pode ser restabelecido com a renutrição, como afirmou posteriormente Borba et al. (2000), ao verificar que a renutrição tardia, a partir de 42 dias, pode reverter danos permanentes aos neurônios nitrérgicos do córtex visual. Ainda com a renutrição, foi observado um restabelecimento no volume e no número de células piramidais do hipocampo (DIAZ-CINTRA et al., 1994), na liberação de noradrenalina e densidade neuronal cortical (SOTO-MOYANO et al., 1999) e uma recuperação, a níveis próximos dos normais, no formato e na orientação dendrítica nos neurônios nitrérgicos do córtex visual (BORBA et al., 2000).

2.5 O córtex cerebral

A superioridade do homem sobre todos os seres vivos é devido ao desenvolvimento do cérebro e, mais especialmente, a partir do córtex cerebral do mesmo (TESTUT; LATARJET, 1945), sendo que este é caracterizado por sua laminação (WILLIAMS et al., 1995).

A partir do ponto de vista filogenético, o córtex começa a aparecer nos répteis, contudo é nos mamíferos que ele adquire sua maior evolução, enquanto que, nos invertebrados inferiores, incluindo as aves, os encéfalos são ocupados, em sua maior parte, pelos núcleos da base. Ao se comparar mamíferos de tamanhos distintos, porém dentro da mesma espécie, descobriu-se que os encéfalos de animais de pequeno porte é muito mais liso (lisencéfalo) que o daqueles de maior porte (girencéfalos). Isto ocorre devido ao preguiosamente que se faz necessário para o desenvolvimento do córtex cerebral proporcionalmente ao desenvolvimento de outras partes do encéfalo (TESTUT; LATARJET, 1945).

O córtex cerebral tem sido estudado durante vários séculos. Foi examinado pelos primeiros microscopista por volta de 1776. Com o aperfeiçoamento da microscopia em 1830, investigações mais efetivas sobre a organização do córtex foram realizadas e estas continuaram ininterruptamente produzindo um volume crescente de trabalhos. Observações microscópicas iniciais foram estimuladas, principalmente, pelas técnicas de Nissl, Golgi, Cajal e Weigert. Mesmo anteriormente, com métodos inferiores, as lâminas corticais foram primeiramente descritas em 1840 por Baillarger, e em 1867-8 por Meynert, com ênfase na estrutura de fibras, ou mieloarquitetura. Posteriormente, baseado apenas em material corado pelo método de Nissl, prevaleceu um esquema de seis camadas adotado em 1909 por Brodmann. A partir deste estudo, um padrão de seis lâminas tornou-se quase um dogma e conduziram ao reconhecimento de grandes variações nas diferentes regiões do córtex ou “áreas”, resultando nos “mapas de Brodmann”, esquema que ainda é quase universalmente utilizado (WILLIAMS et al., 1995) (Figura 2).

O entendimento do córtex cerebral foi realizado em duas abordagens: a laminação tangencial e a organização vertical (isto é, em ângulos retos com a superfície pial) são universalmente aceitas, sendo estas características estabelecidas como a principal do “circuito” básico do córtex (WILLIAMS et al., 1995).

Figura 2 - Laminação cortical

Fonte: (STANDRING, 2008)

Legenda: Representação esquemática das lâminas corticais através técnicas de Golgi, Nissl e Weigert.

2.5.1 Desenvolvimento do córtex cerebral

Todo o sistema nervoso central desenvolve-se das paredes do tubo neural, sendo que este desenvolve-se da placa neural, através de um processo conhecido como neurulação que, em humanos, acontece por volta dos 22 dias após a fecundação. A formação do tubo neural é um processo complexo e depende, dentre outras coisas, da sequência específica da expressão gênica que é controlada, em parte, pela posição e pelo ambiente químico em que a célula se encontra, não sendo surpreendente que esse processo seja altamente sensível a elementos químicos ou deficiências nutricionais (MORGANE et al., 1993; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

Durante a diferenciação do tubo neural, há a formação de três vesículas primárias: o prosencéfalo (rostralmente), o mesencéfalo e o rombencéfalo (caudalmente). Após a formação das vesículas primárias, há o surgimento das vesículas secundárias em ambos os lados do prosencéfalo, chamadas vesículas telencefálicas. A dilatação dessas vesículas encefálicas, causada pela proliferação neuronal formam o telencéfalo basal e o córtex cerebral. Assim, indiscutivelmente, a estrutura mais importante do prosencéfalo é o córtex cerebral (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

2.5.2 Gênese neuronal do córtex cerebral

Segundo Bear, Connors e Paradiso (2008), as estruturas neuronais se desenvolvem em três estágios principais: proliferação, migração e diferenciação celular.

Proliferação celular: fase relacionada à multiplicação (hiperplasia) das células da matriz precursoras dos neurônios e das células da glia (MORGANE et al., 1993).

As paredes das vesículas telencefálicas são constituídas por apenas duas lâminas: a zona ventricular e zona marginal, sendo que a zona ventricular reveste o interior de cada ventrículo e a zona marginal volta-se para a pia-máter que envolve todo o conjunto. A figura 3 ilustra o processo de proliferação celular:

1. Uma célula da zona ventricular estende um processo que ascende rumo à pia-máter.
2. O núcleo da célula migra para cima, desde a face ventricular em direção à superfície pial, onde seu DNA é transcrito.
3. O núcleo contendo duas cópias completas do DNA retorna a superfície ventricular.
4. A célula retrai a sua projeção à superfície da pia-máter.
5. A célula se divide em duas.

Figura 3 - Esquema da proliferação celular

Fonte: (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008)

Legenda: (a) os números circulados correspondem às descrições abaixo. (b) após clivagem vertical as células recém-formadas permanecem na zona ventricular. (c) após clivagem horizontal, as células recém-formadas que estão mais distantes da zona ventricular param de se dividir e migram.

O destino das células recém-formadas depende do modo como aconteceu o processo de clivagem (horizontal ou vertical). Portanto, após uma clivagem vertical, as duas células recém-formadas permanecem na zona ventricular para, novamente, se dividirem por diversas vezes. Esse modo de divisão celular predomina no início do desenvolvimento, a fim de expandir a população de neurônios e, este padrão se repete até que todos os neurônios e células da glia tenham sido formados. Posteriormente, no desenvolvimento, a clivagem horizontal predomina. Neste tipo de clivagem, as células recém-formadas, que estão mais distante da superfície ventricular, migram-se e posicionam-se no córtex cerebral, onde nunca mais se dividirão novamente (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

Migração celular: estágio de desenvolvimento em que as células neuronais e gliais recém-formadas se deslocam, a fim de alcançarem seu posicionamento definitivo (MORGANE et al., 1993)

Segundo Bear, Connors e Paradiso (2008), as células migram deslizando ao longo de finas fibras que irradiam da zona ventricular rumo à pia-máter. Essas fibras são derivadas de células gliais radiais, que são células especializadas, proporcionando a base a qual o córtex

será formado. Quando a estrutura cortical encontrar-se completa, as células migratórias removem seus processos radiais.

As primeiras células a migrarem para longe da zona ventricular destinam-se a residir em uma camada, chamada subplaca. Outras células cruzam a subplaca e formam uma outra camada celular, chamada de placa cortical que, por sua vez, formará a lâmina VI, ou seja, as primeiras células que chegarem à placa cortical tornar-se-ão os neurônios da lâmina multiforme. A partir da formação desta lâmina, em seguida, serão formadas as lâminas V, seguida pela formação da lâmina IV e, assim por diante, de modo que, cada nova migração segue além daquelas já existentes na placa cortical, desta forma, o córtex é formado de dentro para fora (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008). A Figura 4 ilustra este processo.

Diferenciação celular: condição em que as células neuronais e gliais aumentam de tamanho (hipertrofia), expressam seu fenótipo e se especializam (MORGANE et al., 1993).

Nesta fase as células tomam aparência e característica de neurônios, ou seja, os neurônios das lâminas V se diferenciam em neurônios piramidais com um grande dendrito apical, que se estende verticalmente em direção à pia-máter, e por um axônio que se projeta em sentido oposto. Incrivelmente, esta diferenciação acontece anteriormente às células da lâmina IV migrarem para a placa cortical. Assim, o córtex cerebral assemelha-se a uma colcha de retalhos, com muitas áreas estruturais distintas costuradas juntas (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

Para Dobbing (1979), os processos de proliferação, migração e diferenciação celular que, em humanos, estende-se desde o terceiro trimestre da gestação até o segundo ou terceiro ano de vida, ou seja, pré e pós-natal, no rato estes processos acontecem a partir do nascimento até o fim do aleitamento, ou seja, pós-natal e são muito vulneráveis às deficiências nutricionais (Figura 5).

De acordo com Morgane et al. (1993), a subnutrição altera os ritmos dos processos acima citados, alterando os estágios posteriores de desenvolvimento que dependem de eventos primários.

Figura 4 - Esquema da formação do córtex cerebral através do processo de migração celular

Fonte: (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008)

Legenda: Observar na região da zona intermediária os processos radiais das células gliais radiais que serão removidos após a formação da estrutura cortical.

Figura 5- Curvas de crescimento cerebral de sete espécies de mamíferos

Fonte: (DOBBING; SANDS, 1979).

Legenda: Observar os picos de crescimento encefálico entre o homem e o rato.

2.5.3 Estratigrafia do córtex cerebral

O córtex (do *latim* casca, invólucro) ou páleo (do *latim* manto) está relacionado ao sistema de atividade motora e sensitiva e pode ser dividido em **arquicórtex**, filogeneticamente é uma parte antiga, forma o hipocampo e o giro dentado; **paleocórtex**, parte mais antiga do córtex cerebral, encontrado em regiões ligadas à sensibilidade olfatória primária; e **neocórtex**, filogeneticamente mais recente, também conhecido como isocórtex devido ao padrão básico semelhante na distribuição de suas células e lâminas. Este último consitui a maior parte do córtex cerebral (WILLIAMS et al., 1995; STANDRING, 2008; DAUBER, 2009).

Segundo Testut e Latarjet (1945), no córtex cerebral distinguem-se seis lâminas, cada uma apresenta seu nome de acordo com a forma dos corpos celulares que determinam a sua estrutura. Esta descrição habitual (nomenclatura e numeração) de uma estrutura cortical em seis lâminas, como já mencionado anteriormente no tópico 2.5 e figura 2, foi divulgada com sucesso em 1909 por Brodmann e seus seguidores (WILLIAMS et al., 1995).

Então, realizar-se-á uma descrição das lâminas do córtex cerebral, de superficial para profundo, segundo Testut e Latarjet (1945) e Williams et al. (1995), porém, a nomenclatura foi corrigida para os dias atuais com base na Terminologia Anatômica (2001). A figura 6 ilustra as descrições a seguir.

A primeira camada ou **lâmina molecular (I)** recobre todo o córtex cerebral. São encontradas as células fusiformes ou horizontais, conhecidas como células de Cajal, e algumas células piramidais modificadas, orientadas tangencialmente. Estas células encontram-se esparsamente espalhadas, envolvidas por uma massa compacta de fibras tangenciais oriundas dos dendritos apicais das células piramidais e dos axônios verticais das células granulares, além de fibras aferentes corticais de projeção e de associação.

Na segunda camada ou **lâmina granular externa (II)** encontram-se numerosas células granulares pequenas e justapostas e, ainda, podem ser observadas pequenas células piramidais com densidade variada. Atravessando-a, estão os dendritos e axônios verticias oriundos das lâminas subjacentes. Nesta lâmina, os aferentes ascendentes fazem extensos e múltiplos contatos sinápticos com os dendritos apicais provenientes das grandes células piramidais das lâminas III e V.

A terceira camada ou **lâmina piramidal externa (III)** compreende as células piramidais. Pode ser subdivida em três zonas de acordo com o tamanho das células: pequenas,

médias e grandes, sendo as células de maior tamanho posicionadas mais profundamente nesta lâmina. Podem ser observadas células granulares dispostas horizontal e verticalmente, com dendritos e axônios que se estendem muito além da camada.

A quarta camada ou **lâmina granular interna (IV)**, em geral é a lâmina mais estreita, exceto pela lâmina I. Compreende numerosas e pequenas células granulares, além de pequenas células piramidais ocasionais, sendo estes corpos celulares densamente agregados. Como nas demais lâminas, esta contém grande quantidade de dendritos e axônios verticais oriundos de neurônios das lâminas adjacentes, de outras áreas corticais e das regiões subcorticais. Esta lâmina, durante muito tempo foi conhecida como “*faixa externa de Baillarger*” devido a grande concentração de fibras horizontais. Segundo a Terminologia Anatômica (2001), esta faixa recebe o nome de “*estria da lâmina granular externa*” e para Dauber (2009), esta grande concentração de fibras horizontais são ramificações de neurofibras aferentes.

A quinta camada ou **lâmina piramidal interna (V)** compreende as células piramidais volumosas e dispersas, porém pequenas células piramidais também podem ocorrer, ambas variando nas diferentes áreas do córtex, todavia, independente da área, as maiores células piramidais estão dispostas nesta lâmina. São particularmente bem desenvolvidas na região do sulco central. Esta lâmina pode se dividida em duas zonas, uma superficial e outra profunda de acordo com o volume das células, sendo as maiores posicionadas mais profundamente. Pequenas células granulares também podem ser observadas.

Os corpos celulares são circundados por um denso aglomerado de dendritos e axônios provenientes de células de outras lâminas, sendo também, atravessada por fibras de projeção e de associação ascendentes e descendentes. Esta lâmina, também foi conhecida como “*faixa interna de Baillarger*” devido a grande concentração de fibras horizontais. Segundo a Terminologia Anatômica (2001), esta faixa recebe o nome de “*estria da lâmina piramidal interna*” e para Dauber (2009), esta grande concentração de fibras horizontais é formada por neurofibras colaterais de axônios de células piramidais.

A sexta camada ou **lâmina multiforme (VI)** compreende células cujo eixo maior está orientado perpendicularmente à superfície do córtex cerebral. Pode subdividir-se em duas zonas, uma zona superior, mais espessa, onde são observadas células justapostas e, uma zona inferior, contendo células mais dispersas. As células, na sua maioria, são pequenas e consideradas como células piramidais modificadas. A forma variável de seus corpos celulares (fusiformes, triangulares, ovóides, entre outros) pode refletir nas variações de seus arranjos

foram descritos e classificados em riqueza de detalhes, porém, podem ser resumidamente agrupados, com a maioria pertencendo a duas classes: as células piramidais e as células estreladas (granulares), sendo que ambos os tipos podem ser classificados em subdivisões variáveis de acordo com seus tamanhos relativos, formas e arranjos neuríticos, embora quantidades e distribuição variem grandemente nas diferentes áreas corticais.

As células piramidais são os tipos celulares característicos do córtex cerebral. Para Williams et al. (1995), cerca de dois terços (66%) dos neurônios são piramidais, o terço restante é não piramidal. Testut e Latarjet (1945) ressaltam a importância de se evidenciar a riqueza de conexões entre neurônios piramidais. Segundo esses autores, em nenhuma outra parte do sistema nervoso encontram-se prolongamentos dendríticos tão desenvolvidos como nessas células.

Morfologicamente, as células piramidais são assim denominadas de acordo com suas formas somáticas (WILLIAMS et al., 1995) e possuem uma base voltada para a substância branca e seu ápice voltado para o exterior (pia-máter). Estas células podem ser pequenas, médias, grandes ou gigantes, sendo estas últimas conhecidas como células de Betz e, são células características da região motora. Possuem um dendrito apical, que ascende verticalmente, e que termina na lâmina mais superficial do córtex cerebral. Possuem, ainda, prolongamentos basilares horizontais e curtos, extremamente ramificados. (TESTUT; LATARJET, 1945; ERHART, 1974). Para Colonnier (1964) e Williams et al. (1989), os dendritos basilares se espalham lateralmente e possuem forma e extensão variadas. De um modo geral, a extensão vertical dos prolongamentos dendríticos dessas células é acentuadamente maior do que aqueles das direções horizontal ou tangencial.

Relativamente ao axônio das células piramidais, este desce em direção à substância branca para seguir para outro ponto do córtex no mesmo hemisfério (fibras de associação); ou em outro hemisfério (fibras comissurais); ou para regiões cerebrais subjacentes (fibras de projeção) (TESTUT; LATARJET, 1945; ERHART, 1974). Segundo Williams et al. (1989), os axônios das células piramidais possuem diâmetro menor e comportam-se de modo variável. Os axônios das células piramidais menores geralmente se ramificam completamente no córtex cerebral, enquanto aqueles das células piramidais maiores, característicos da lâmina V, estão de acordo com o descrito acima por Testut e Latarjet (1945) e Erhart (1974).

As conexões oriundas das células piramidais podem ser observadas na figura 6, anteriormente citada, bem como na figura 7.

Figura 7 - Representação esquemática ilustrando as conexões neuronais corticocorticais

Fonte: (WILLIAMS et al., 1995).

Legenda: **(A)** Conexidade corticocortical das células piramidais supragranulares, ou seja, as duas células da fileira mais externa na coluna média esquerda (cilindro interno vertical), se conectam, preferencialmente, com espaços de tecido colunar no córtex ipsilateral ou no córtex contralateral, enquanto células infragranulares, ou seja, aquelas da fileira inferior na coluna média à esquerda, e uma célula em uma coluna à direita enviam seus axônios para alvos subcorticais, porém alguns deles dão colaterais principais para colunas corticais contralaterais. **(B)** Conexidade corticocortical em larga escala, tanto ipsilateral quanto contralateral, entre dois córtex coronais em diferentes posições frontooccipitais. Observar que em ambas as letras **(A)** e **(B)**, as células piramidais fazem conexões subcorticais.

As células de axônio curto, assim denominadas por Testut e Latarjet (1945), ou células estreladas, frequentemente chamadas de células granulares, denominadas por Williams et al. (1989). Recebem este nome devido ao seu pequeno tamanho e aspecto granular do seu material citoplasmático. São observadas em densidade variável em todas as lâminas corticais exceto na lâmina molecular, todavia são em grande abundância nas lâminas II e IV. Após as células piramidais que respondem por 66% da população neuronal cortical, as células granulares aparecem em segundo lugar representando 33% desta população neuronal (WILLIAMS et al., 1995).

As células granulares possuem corpo redondo, alongado em vários ângulos por dendritos densamente ramificados e um único axônio curto. Estas células estão confinadas ao córtex, entretanto, podem viajar nele por distâncias consideráveis, principalmente na direção vertical (WILLIAMS et al., 1995).

Já as células horizontais de associação estão situadas na lâmina mais superficial do córtex cerebral (TESTUT; LATARJET, 1945), ou seja, estão confinadas à lâmina molecular. São pequenas e fusiformes e seus dendritos espalham-se a curtas distâncias nas duas direções opostas na lâmina I (WILLIAMS et al., 1995). Seu corpo apresenta-se alargado

horizontalmente e seu axônio é, também, horizontal e, também são conhecidas como células de Cajal (TESTUT; LATARJET, 1945). Para Williams et al. (1995), seus axônios, frequentemente, originam-se de um dendrito, depois dividem-se em dois ramos que se afastam um do outro para percorrer distâncias maiores na mesma camada.

2.5.5 Áreas do córtex cerebral

De acordo com Erhart (1974), distinguem-se no córtex cerebral numerosas áreas, as quais atribuem-se limites e funções mais ou menos estabelecidas. Elas diferem entre si pela espessura e composição das camadas celulares, porém, de acordo com sua respectiva arquitetura, podem ser agrupadas em cinco áreas fundamentais: I, II, III, IV e V que estão ilustradas na figura 8.

Figura 8 - Esquema da estrutura do córtex cerebral

Fonte: (STANDRING, 2008)

Legenda: Observar as diferenças nas espessuras e composições das camadas de acordo com as regiões do córtex.

A seguir, observa-se a descrição das características das áreas corticais de acordo com Erhart (1974), porém a nomenclatura foi corrigida com base na Terminologia Anatômica (2001).

Área cortical tipo I = muito espessa, desprovida, quase que completamente, de células granulares; possui elevado número de células piramidais. É típico do giro pré-central.

Área cortical tipo II = moderadamente espessa, apresenta a lâmina IV (granular interna) muito desenvolvida e muitas células piramidais grandes nas lâminas III e V. É característico do giro pós-central.

Área cortical tipo III = possui espessura média, observa-se as lâminas granulares externa e interna muito desenvolvidas e apresenta estratificação bastante nítida. As células piramidais são predominantemente pequenas e as lâminas III e V são delgadas. Pode ser encontradas no lóbulo parietal inferior, na maior parte do giro temporal superior e no giro occipitotemporal lateral.

Área cortical tipo IV = muito delgada, caracteriza-se pela grande densidade celular em todas as camadas. É encontrada no polo frontal, nas porções basilar e medial dos giros orbitais, no polo occipital, no cúneo e no giro occipitotemporal medial.

Área cortical tipo V = também bastante delgada, caracteriza-se pela existência de células granulares em todas as camadas. Sua estratificação é pouco nítida porque é pequeno o número de células piramidais nas camadas III e V. É encontrada na margem posterior do sulco central, no fundo e margens do sulco calcarino e ao longo da parede dorsal do sulco hipocampal.

Williams et al. (1995) e Standring (2008) classifica as áreas corticais como: 1 - agranular; 2 - frontal; 3 - parietal; 4 - granular; 5 - polar (também ilustradas na figura 8). A descrição para cada uma delas é semelhante à descrição realizada por Erhart (1974).

Para Williams et al. (1995) e Standring (2008), os tipos agranular e granular são heterotípicos, ou seja, dois do padrão de seis camadas são considerados como virtualmente ausentes. Os tipos frontal, parietal e polar são considerados homotípicos, ou seja, todas as seis camadas estão presentes.

Em seguida, encontra-se a descrição das características das áreas corticais de acordo com Williams et al. (1995) e Standring (2008). Da mesma forma, sempre que necessário a nomenclatura foi corrigida de acordo com a Terminologia Anatômica (2001).

Área 1 – tipo agranular = é considerado destituído de lâminas granulares, ou estas estão diminuídas, contudo sempre contém corpos celulares granulares espalhados. O tipo piramidal é proeminente, onde pode-se observar a maior densidade e o maior tamanho destes elementos. Está relacionado às áreas motoras, salvo que tais áreas também recebem projeções aferentes. É caracterizado pela projeção de grande quantidade de axônios oriundos de células piramidais.

Área 2 – tipo granular = as lâminas granulares são desenvolvidas ao máximo. Podem ser observados diversos e pequenos neurônios piramidais entre as células granulares densamente compactadas. As lâminas piramidais externa e interna são pobremente desenvolvidas ou não identificáveis. Está associado a projeções aferentes oriundas das poucas células piramidais existentes, porém fibras eferentes menos numerosas podem ser evidenciadas

Área 3 – tipo frontal = não está confinado à região frontal e sua característica é a grande quantidade de neurônios piramidais de tamanho médio e pequeno nas lâminas III e V.

Área 4 – tipo parietal = assim como o tipo frontal, este não está confinado à região parietal. As lâminas granulares externa e interna são mais largas e contêm grande quantidade de células granulares. Em geral, as células piramidais são menores que aquelas observadas no tipo frontal.

Área 5 – tipo polar = identificado como pequenas áreas próximas aos pólos frontal e occipital e é a forma mais delgada do córtex. A lâmina multiforme é mais organizada que nos outros tipos e a lâmina piramidal externa é reduzida e pouco invadida por células granulares.

2.6 Coloração de Nissl através da solução da violeta cresil

No final do século XIX, o alemão Franz Nissl, mostrou que um tipo de corante básico corava o núcleo de todas as células, além de corar um material agrupado ao entorno dos núcleos dos neurônios. Esses agrupamentos foram denominados corpúsculos de Nissl e a técnica ficou conhecida como “coloração de Nissl” através da solução de violeta de cresila. Esta técnica é uma das mais utilizadas por duas razões: primeiramente, porque permite a diferenciação dos neurônios dos elementos da glia e, em segundo lugar, porque permite estudar o arranjo, ou citoarquitetura, dos neurônios em diferentes partes do encéfalo (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008)

O método de Nissl utiliza o cresil violeta ou violeta cresil ou, ainda, violeta de cresila, um corante de absorção básico utilizado para evidenciar o citoplasma de neurônios o qual contém várias estruturas, inclusive os corpúsculos de Nissl (ou substância de Nissl). Esses corpúsculos são compostos, basicamente, de RNA. Dessa maneira, tal coloração serve como indicador da viabilidade neuronal, pois com a ocorrência de lesão neuronal, esses corpúsculos podem desaparecer, fenômeno conhecido como cromatólise (SCORZA et al., 2006) (Figura 9).

Técnicas como a de Nissl revelam somente a variação estrutural e a distribuição dos corpos celulares dos neurônios. Inicialmente, o mapeamento citoarquitetônico do córtex cerebral, baseado em Nissl, atraiu mais atenção dos estudiosos e seu uso continuado juntamente a outras técnicas levou ao parcelamento do córtex em diferentes áreas (WILLIAMS et al., 1995)

Em estudos clássicos, materiais corados pelo método de Nissl, principalmente aqueles realizados em mamíferos inferiores como, por exemplo, os roedores, conduziram ao reconhecimento de muitos tipos de neurônios, entre eles as células granulares, piramidais e estreladas, sendo estas separadas de acordo com seu tamanho em pequenas, médias e grandes (WILLIAMS et al., 1995).

Porém, para o desenvolvimento dos estudos com o córtex cerebral, a coloração pelo método de Nissl foi associada a outras técnicas como, por exemplo, o método de Golgi, que juntos fornecem preparações contrastantes das células nervosas corticais, que ilustram uma informação mais utilizável, as quais revelam as interconexões entre os neurônios corticais. Desta forma, para estes autores, esta abordagem é inevitavelmente mais apropriada do que o simples estudo citoarquitetural, uma vez que ambos os métodos geralmente não conflitam, mas é superiormente mais informativo (WILLIAMS et al., 1995).

Ainda, baseada na coloração pelo método de Nissl, as células granulares receberam este nome devido à aparência granular de seu material citoplasmático muito bem corado por esta técnica (WILLIAMS et al., 1995).

Figura 9 - Cromatólise em materiais corados pelo método de Nissl

Fonte: (NOBREGA, 1986)

Legenda: **(a)** Animais controle. Notam-se neurônios de limite celular nítidos, quantidade normal de corpúsculos de Nissl, presença de poucas células neurogliais, e poucas fibras oriundas dos astrócitos de aspecto delgado. **(b)** Animais subnutridos durante a gestação e aleitamento. Notam-se neurônios menores e de limites pouco precisos. Aumento de células neurogliais e grande número de fibras oriundas dos astrócitos de aspecto grosseiro.

2.7 Avaliação e classificação da composição corporal através do Índice de Lee e da circunferência abdominal

Existem vários métodos para a determinação e classificação da composição corporal. Por serem métodos de fácil aplicação e menos onerosos, os mais usados são o índice de massa corporal (**IMC**), a circunferência abdominal e as dobras cutâneas para determinação do percentual de gordura (OLIVEIRA; COSTA; RIBEIRO, 2008).

O IMC é um método de medida indireta da gordura corporal que é amplamente usado dado a sua praticidade, simplicidade e confiabilidade na indicação da gordura corporal. O IMC é obtido pela divisão da massa corporal (Kg) pela estatura (m) ao quadrado, e é o método mais utilizado para estudos epidemiológicos relacionados à obesidade. Contudo, o IMC perde a confiabilidade quando o indivíduo possui grande massa livre de gordura, conhecida como “massa magra ou massa muscular”, ou subestimar a percentagem de gordura corporal em indivíduos que possuem pouca massa muscular como idosos, indivíduos com doenças crônicas, entre outros, por não determinar exatamente a distribuição desta gordura corporal (OLIVEIRA; COSTA; RIBEIRO, 2008).

Um dos métodos de analisar os índices de obesidade ou de adiposidade em animais é conhecido como índice de Lee, dado pela fórmula: Índice de Lee = raiz cúbica do peso

corporal (g) dividido pelo comprimento naso-anal (cm) multiplicado por 10 (BERNARDIS; PETERSON, 1968), ou multiplicado por 1000 (PLOCHER; POWLEY, 1977; RIBEIRO, 2010). Diferentemente do IMC, o índice de Lee não possui um nível classificatório, desta forma, elevados valores resultante do índice de Lee, revelam maior propensão de apresentar altos graus de obesidade ou adiposidade (BERNARDIS; PETERSON, 1968; RIBEIRO, 2010).

Leme et al. (2008), utilizaram o índice de Lee como parâmetro para a avaliação dos efeitos do exercício físico e do tratamento com metformina sobre os aspectos endócrino-metabólicos de ratos obesos de ambos os sexos. Neste trabalho os autores concluíram por meio da avaliação do índice de Lee, que tanto o treinamento físico quanto o tratamento com a metformina mostraram-se eficazes no combate a alterações endócrino-metabólicas impostas pela obesidade.

Ribeiro (2010) aplicou o índice de Lee como indicativo de sobrepeso e/ou obesidade para ratos submetidos aos efeitos do destreinamento, após período de treinamento intervalado onde concluiu que, este tipo de exercício com estas características de intensidade e frequência, não se mostrou suficiente e eficiente para controlar os níveis de sobrepeso e obesidade.

Plocher e Powley (1977) usaram o índice de Lee para avaliação da manutenção da obesidade em camundongos obesos e hiperglicêmicos seguida de hipofisectomia. A partir desta avaliação, eles concluíram que a hipofisectomia resultou em uma perda de peso moderada em camundongos obesos e atenuou novos aumentos de adiposidade, porém, não conseguiu eliminar a adiposidade já estabelecida anteriormente à cirurgia.

Variáveis antropométricas, tais como a circunferência abdominal, têm sido utilizada em estudos epidemiológicos a fim de estimar a proporção do tecido adiposo abdominal. A circunferência abdominal é obtida posicionando-se o paciente em pé, ereto, abdome relaxado, pés afastados a uma distância de 25 - 30 cm, sendo que a fita deve ser passada na menor curvatura entre as costelas e a crista ilíaca. Para Oliveira, Costa e Ribeiro (2008) este método é de fácil execução e possui grande reprodutibilidade sem ser oneroso. Contudo, é importante ressaltar que esta medida não diferencia a gordura visceral da gordura subcutânea.

Falcão-Tebas et al. (2012) fizeram uso da circunferência abdominal para avaliação dos efeitos do treinamento físico durante a gestação sobre a evolução ponderal, glicemia e colesterolemia de ratos adultos submetidos à subnutrição perinatal e observaram que os valores médios da circunferência abdominal relativa ao peso corporal dos filhotes de mães desnutridas foram maiores comparados ao controle, porém, no grupo de animais oriundos de mães treinadas desnutridas não houve diferença em relação ao controle.

2.8 Óxido nítrico e o sistema nervoso

Thomas e Pearse (1964) relatam que, em 1961, eles descreveram pela primeira vez a presença de neurônios grandes e isolados, dispersos em todo córtex cerebral e nos núcleos da base. Segundo estes autores, essas células são diferentes de outros elementos nervoso por sua disposição solitária e seu elevado teor de NADPH. Então denominaram-as de "solitárias células hiperativas" e, posteriormente, a fim de se evitar mal-entendidos, uma vez que a intenção não era a de atribuir à estas células uma função patológica, foram chamadas de "solitárias células nervosas ativas".

Na presença de concentrações relativamente altas de NADPH, um sal solúvel de *tetrazolium* (um substrato sintético), era reduzido a partículas insolúveis, os grânulos de formazan. Estes grânulos, de coloração azul, precipitavam-se onde havia atividade enzimática no tecido. Essa atividade de NADPH-d, caracterizava-se pelo requerimento imprescindível de NADPH. A precipitação destes grânulos foi responsável pela intensa marcação no corpo celular e em dendritos dos neurônios NADPH-d positivos e, estes podem ser observados à microscopia de luz convencional (THOMAS; PEARSE, 1964). Para Scherer-Singler et al. (1983), estas células, as quais foram referidas por Thomas e Pearse em 1961, são neurônios que produzem NO, e que, podem ser identificados através de técnicas histoquímicas onde ocorre a redução do NBT (*Nitroblue Tetrazolium*) na presença de NADPH.

Em relação às células NADPH-diaforase positivas, sabe-se que estas apresentam resistência a injúrias metabólicas (THOMAS; PEARSE, 1961; 1964). Uma hipótese para esta proteção poderia estar relacionada ao fato de estas células serem responsáveis pela síntese do óxido nítrico (VALTSCHANOFF et al., 1993). O óxido nítrico é considerado uma molécula gasosa, altamente difusível e, que atua como um neurotransmissor não convencional e em baixas concentrações, possuindo, portanto, um papel neuroprotetor no sistema nervoso central (SNYDER, 1992).

A histoquímica da NADPH-d é o método mais amplamente utilizado para revelar a distribuição da óxido nítrico sintase no sistema nervoso, a qual é uma enzima biologicamente responsável pela síntese o óxido nítrico (KNOWLES et al., 1989). Vale aqui salientar que foi com esta técnica, que a anatomia dos neurônios produtores de óxido nítrico foi descrita no sistema nervoso de várias espécies de animais (VINCENT; KIMURA, 1992; YAN; GAREY; JEN et al., 1994).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Ao se observar o panorama resultante dos efeitos da subnutrição sobre órgãos importantes na atuação e na adaptação do homem na sociedade, como é o caso do encéfalo, impõe-se saber se as alterações sobre o sistema nervoso, decorrentes da subnutrição pré e pós-natal, são permanentes ou se há possibilidade de recuperação, a partir do restabelecimento precoce, bem como tardio, através de uma dieta equilibrada.

3.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos da subnutrição e da renutrição precoce (a partir do desmame) e tardia (a partir dos 42 dias de vida) nas dimensões corpóreas e encefálicas, no córtex cerebral e em parâmetros metabólicos de ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar nos animais submetidos às diferentes dietas (normoprotéica e hipoprotéica):

1. As características físicas e comportamentais;
2. Os padrões como ingestão alimentar e hídrica e excreção de fezes e urina e a razão entre estes parâmetros;
3. O peso corporal em diferentes períodos de vida;
4. O peso encefálico e a razão *peso encefálico/peso corporal*;
5. O comprimento naso-anal e a circunferência abdominal;
6. O grau de adiposidade determinado pelo índice de Lee;
7. As dimensões encefálicas e a espessura cortical;
8. A citoarquitetura do córtex cerebral;
9. A estimativa da média do número de neurônios, da densidade de volume neuronal, bem como, da área dos corpos neuronais corticais e nitrérgicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo (ICB III - USP).

4.1 Acasalamento, gestação e obtenção das ninhadas

Para a formação dos grupos experimentais, foram utilizados *Rattus norvegicus* machos, da linhagem Wistar Hannover e heterogênicos, produzidos a partir dos acasalamentos onde as matrizes foram submetidas às diferentes dietas adotadas neste estudo.

Os animais utilizados neste experimento foram mantidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da Sociedade Brasileira em Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 2170/2011).

Os animais utilizados para o acasalamento foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), e mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do mesmo Instituto. Todos os animais do presente estudo (desde o acasalamento até o final do período experimental) foram acondicionados em salas climatizadas, com a temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e fotoperíodo (ciclo claro/escuro) de 12 horas. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas de polipropileno (41x34x16cm), onde a cama era feita por uma camada de maravalha (raspa de madeira), dispostas em estante vertical, durante os períodos de acasalamento e aleitamento.

Para o acasalamento, as fêmeas foram induzidas ao ciclo estral (com duração de 4 a 5 dias) através do “Efeito *Whitten*”, que se caracteriza pela exposição da fêmea ao odor causado pela urina do macho, promovendo na fêmea a liberação de gonadotrofina e ativando o ciclo ovariano de forma sincronizada (WHITTEN, 1956). Para isto, por 2 dias, as fêmeas foram transferidas para a caixa dos machos, e estes foram alocados em outra caixa. Após esse período, o macho foi introduzido junto às fêmeas, “receptivas ao acasalamento”, estabelecendo-se o sistema poligâmico ou harém, com um macho para duas fêmeas (com

idades entre 60 e 90 dias) em caráter temporário, ou seja, a permanência do macho com as fêmeas perdurou-se por um período de dez dias.

A partir do primeiro dia do acasalamento foi alterada a dieta padrão do biotério (*pelets*) para a dieta para roedores (AIN-93G) oferecida sem restrições, de acordo com a formação dos grupos experimentais básicos, Nutridos (N) e Subnutridos (S). As dietas foram estabelecidas em conformidade com o protocolo preconizado pelo “*American Institute of Nutrition*” (REEVES; NIELSEN; FAHEY-JÚNIOR, 1993), e preparadas em laboratório especializado¹ (Figura 10).

Figura 10 - Composição das dietas experimentais

Dieta AIN-93G	Dieta padrão	Dieta hipoprotéica
Umidade	8,4%	7,8%
Proteína bruta (caseína)	20%	5,2%
Extrato etéreo	7,2%	7,0%
Matéria fibrosa	4,1%	5,0%
Matéria mineral	2,8%	2,8%
Cálcio	0,56%	0,5%
Fósforo	0,26%	0,3%
Carboidrato	58,95%	72,2
Caloria	3,8 Kcal/g	3,73 Kcal/g

Fonte: (Rhoister indústria e comércio LTDA, Araçoiaba da Serra, SP., Brasil., 2012)

Legenda: Demonstrativo da composição dos micro e macronutrientes das dietas padrão (normoprotéica) e hipoprotéica.

Findo o período de acasalamento, as fêmeas foram separadas dos machos e mantidas em gaiolas individuais, de acordo com a dieta (N ou S), durante a gestação e a lactação. A partir do nascimento, os filhotes eram avaliados visualmente, de acordo com os seguintes critérios: número de filhotes por ninhada; taxa de natimortos e de morte pós-natal; canibalismo (praticado tanto entre a mãe com os filhotes, como entre os filhotes). Em torno de 3 dias após o nascimento procedia-se à sexagem baseada na distância ano-genital, que no macho, além da visualização do escroto, é bem maior do que na fêmea. Como as ninhadas eram numerosas, padronizou-se o número máximo de 6 filhotes por matriz de acordo com Ahmad e Rahman

¹Rhoister Indústria e Comércio Ltda, Araçoiaba da Serra, SP., Brasil

(1975), priorizando a permanência da maior quantidade de filhotes machos, selecionando-se os mais robustos e com mancha branca detectada por transparência do abdome (característico de presença de leite no estômago), um fator importante, uma vez que os filhotes mais fracos não mamam e, com isso, devem ser descartados (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Avaliou-se nesses filhotes, também, o peso corporal² (**Pn** = peso ao nascimento), a formação e o aspecto da pelagem, o descolamento das orelhas, a abertura dos olhos e a atividade de locomoção.

Sempre que possível, tanto os animais excedentes como as matrizes foram disponibilizados para utilização em outras pesquisas.

À época do desmame (21 dias), os animais dos grupos N e S foram novamente pesados (**Pd** = peso ao desmame) e mantidos individualmente em gaiolas metabólicas³. Estas gaiolas foram fabricadas de acordo com as normativas americanas para o bem estar de animais de laboratório, sendo que sua área interior comporta ratos com mais de 300g, com superfície de 450 cm² e altura de 18 cm (INSTRULAB, 2012). Estas são acondicionadas em estantes verticais apropriadas, para monitoramento de sua ingestão e excreção nos seguintes períodos: I- entre o 22º e o 26º dias; II- entre o 38º e 46º dias; III- entre o 56º e 60º dias. O período II foi aparentemente maior, uma vez que, de 38º a 42º acompanhou-se todos os animais dos grupos experimentais, exceto os animais renutrídos a partir dos 42 dias (Rt60), os quais foram observados entre o 42º a 46º dias, devido à troca da dieta.

Nos intervalos entre os períodos, os animais eram alocados, individualmente, nas caixas de polipropileno com maravalha. A obtenção dos dados relativos à ingestão alimentar e hídrica, excreção de urina e de fezes, bem como o desperdício de água e ração era realizada diariamente nestes períodos, *impreterivelmente* entre as 12 e as 14 horas. Face ao novo ambiente a que foram submetidos, os animais eram também avaliados segundo os aspectos comportamentais e físicos (Figura 11 e 12).

² balança Marte – modelo AS1000C

³ TECNIPLAST®, modelo 3701M081, Buguggiate, Va, Itália

Figura 11 – Gaiolas metabólicas

Fonte: (LUIZ, 2012)

Legenda: (A) gaiola metabólica, (B) estante vertical comportando 12 gaiolas metabólicas, (C) caixas plásticas retangulares em estante de acondicionamento tradicional. (Seta azul) bebedouro, (Seta verde) comedouro com compartimento para desperdício de ração, (Seta roxa) tubo coletor para desperdício de água, (Seta branca) tubo coletor de fezes e (Seta rosa) tubo coletor de urina.

Figura 12 - Monitoramento dos animais nas gaiolas metabólicas

Câmara de alimentação bi-partida está localizada fora da gaiola. A parte frontal capta os restos da alimentação impedindo a contaminação das fezes. O tamanho do alimentador impede que o roedor aninhe-se ou durma dentro deles. Fornecido em cinco tamanhos.

Equipamento calibrado para garantir melhor medida. Dreno para resto de bebidas coleta as sobras de forma a impedir contaminação na urina.

Gavetas de alimentação são removíveis da câmara para facilitar o reabastecimento sem incomodar o animal.

A urina escorre diretamente na superfície do funil coletor e cai diretamente do anel para o tubo de coleta.

Um simples giro desconecta os tubos de coleta de urina e de fezes. Não há necessidade de desmontar a gaiola ou incomodar o animal.

Toda a parte inferior da gaiola pode ser facilmente removida. Isto facilita a limpeza durante as múltiplas fases do ensaio.

Elementos intercambiáveis próprios para acomodar três diferentes tamanhos de camundongos, ratos pequenos ou adultos. As gaiolas metabólicas também são disponíveis para ratos com mais de 300 gramas.

Fonte: (INSTRULAB, 2012)

Legenda: Representação ilustrativa do manejo dos animais nas gaiolas metabólicas.

4.2 Formação dos grupos experimentais

Neste item serão descritos os critérios para a formação dos grupos de animais Nutridos (N), Subnutridos (S) e Renutridos (R).

4.2.1 Grupos de 42 dias: N42, S42 e Rp42

Esses grupos foram formados a partir do 22º dia, até os animais atingirem 42 dias. Desta forma, considerou-se como pertencentes ao grupo **N42** (*Controle negativo – normal ou nutrido*), os animais submetidos à dieta protéica ou padrão (normoprotéica); aqueles submetidos à dieta hipoprotéica, formaram o grupo **S42** (*Controle positivo – subnutrido*). O grupo **Rp42** (*Tratado – renutrido precoce*) foi constituído por animais do grupo S, que aos 22 dias passaram a receber a dieta normoprotéica.

4.2.2 Grupos de 60 dias: N60, S60 e Rt60

Estes grupos, como descrito no item anterior, também foram estabelecidos a partir do 22º dia de vida. Assim, os animais submetidos à dieta protéica ou padrão (normoprotéica) formaram o grupo **N60** (*Controle negativo – normal ou nutrido*), enquanto que os animais submetidos à dieta hipoprotéica constituíram o grupo **S60** (*Controle positivo – subnutrido*). Aqueles animais do grupo S que, até os 42 dias foram submetidos à dieta hipoprotéica, e a partir desta data foram submetidos à dieta normoprotéica, formaram o grupo **Rt60** (*Tratado – renutrido tardio*).

O fluxograma da figura 13 ilustra os procedimentos para a obtenção dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Figura 13 - Fluxograma do período experimental

FONTE: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Representação esquemática da obtenção dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

4.3 Eutanásia

Os animais de todos os grupos foram submetidos à eutanásia através de método químico inalável em câmara de CO₂ do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB III/USP). O peso de cada animal (**P_{et}** = peso após a eutanásia) foi obtido, antes de serem submetidos aos diferentes procedimentos referentes aos métodos histológicos e histoquímicos da presente pesquisa.

4.4 Obtenção dos encéfalos

Após incisão longitudinal da pele da região da cabeça, que foi completamente retirada a fim de se expor a calvária e a musculatura adjacente, procedeu-se à dissecação da região, com o intuito de se observar a raiz caudal do arco zigomático, bilateralmente (Figura 14B). Em seguida, tomando-se como referência a sutura coronal, determinou-se na raiz de cada arco zigomático um ponto craniométrico que, de acordo com o lado, foram denominados **ZtE** e **ZtD** (Figura 14C). Uma incisão profunda unindo os pontos **ZtD** e **ZtE** foi então realizada, a fim de se demarcar, na superfície do encéfalo, as metades cranial e caudal (Figura 14D).

Aberta a calota craniana, o encéfalo foi exposto, retirado e completamente dividido em suas metades (Figuras 14 E, F), desprezando-se a parte rostral, juntamente com o bulbo olfatório e, posteriormente, o cerebelo. A metade esquerda média foi, então, apoiada em uma base de cortiça, envolvida em meio de inclusão apropriado para congelamento e criosecção⁴ e, finalmente, congelada em nitrogênio líquido com utilização de iso-pentano. (Figuras 14 G-I).

⁴ Killik, EasyPath - EP-51-20081

Figura 14 - Esquema da obtenção dos espécimes utilizados

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: (A) Instrumental cirúrgico (osteótomo ou pinça goiva, pinças, lâminas e cabo de bisturi e meio de inclusão para congelamento) utilizado para remoção do encéfalo da calota craniana e preparação para congelamento. (B e C) Crânio de rato, em vista lateral e superior, evidenciando a linha de corte unindo os pontos craniométricos do arco zigomático (ZtE e ZtD). (D) Exposição do encéfalo posteriormente à osteotomia parcial e total e marcação dos pontos craniométricos. (E e F) Encéfalo de rato, em vista lateral e superior mostrando a linha vertical que representa o corte realizado. (G) Isolamento do espécime utilizado. (H) Suporte de cortiça contendo o espécime e o meio de inclusão para congelamento e finalmente, o processo de congelamento com utilização de iso-pentano (I).

4.5 Avaliações macroscópicas qualitativas

As avaliações macroscópicas **qualitativas** basearam-se nas observações clínicas ao natural, relativas às possíveis mudanças físicas e comportamentais entre os animais de todos os grupos experimentais desde o momento da formação dos grupos básicos (N e S) até a fase final dos períodos experimentais (42 e 60 dias), sendo documentadas, quando necessário, com o auxílio de uma câmera digital⁵.

⁵ Casio EX-Z75

4.6 Avaliações macroscópicas quantitativas

Os parâmetros morfométricos foram determinados relativamente aos aspectos **corporal e encefálico**.

4.6.1 Corporal

Após a eutanásia, determinou-se nos animais de todos os grupos experimentais, a circunferência abdominal (**c-a**), o comprimento naso-anal (**n-a**), e o índice de Lee (**iL**).

Assim, com o animal posicionado em decúbito dorsal sob uma base plana, e com o abdome e os membros (torácico e pélvico) relaxados, a **c-a** foi determinada em centímetros, com o uso de uma fita métrica no entorno do abdome, sempre na altura da cicatriz umbilical.

Também em centímetros, o **n-a** foi obtido com o animal em decúbito ventral, posicionando-se uma fita métrica desde o ápice do nariz à raiz da cauda. Essa medida foi utilizada na avaliação do comprimento corporal dos animais, bem como para a determinação do índice de Lee (**iL**), descrito a seguir.

O **iL** foi obtido a partir do protocolo estabelecido por Bernardis e Peterson (1968), utilizando-se a raiz cúbica do peso corporal (g) dividido pelo **n-a** (cm), e multiplicado por 10. Este índice não possui um nível classificatório (como o índice de massa corporal = IMC), mas infere que um valor elevado do **iL** indica a propensão em apresentar maiores índices de adiposidade.

4.6.2 Encefálico

Tendo o seu peso (**Pe**) determinado, após retirados da caixa craniana, foram determinadas medidas dos encéfalos, tendo como parâmetro a publicação de Bear; Connors e Paradiso (2008). Desta forma, com o auxílio de um paquímetro e fita métrica, foram determinados os comprimentos dos eixos rostro-caudal (**r/c**), látero-lateral (**l/l**) e dorso-ventral (**d/v**) e as circunferências encefálicas maior (**cema** - em torno do eixo rostro-caudal) e menor (**ceme**) - em torno do eixo látero-lateral) (Figura 15).

Figura 15 - Dimensões encefálicas do rato

Fonte: (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008). Modificada por Liberti, E. A. em 13/11/2012.

Legenda: Representação dos principais planos de secção realizados no encéfalo do rato.

4.7 Avaliações microscópicas

Após o congelamento da parte de interesse oriunda de cada encéfalo (item 4.4), estas foram acondicionadas na câmara de um criostato⁶, onde foram mantidas a uma temperatura de -25°C . Em seguida, procedeu-se secções coronais de 15 μm , que foram acomodados em lâminas foscas e lapidadas para histologia, a fim de serem submetidos às diferentes técnicas de coloração histológicas e histoquímicas.

4.7.1 Evidenciação dos neurônios corticais através dos métodos da hematoxilina e eosina, e da violeta cresil (Nissl)

Para a avaliação qualitativa e quantitativa do aspecto geral do córtex cerebral e a citoarquitetura do tecido histológico, as secções foram coradas pelo método histológico da

⁶ Leica Microsystems, modelo CM 1850, Wetzlar, Alemanha

hematoxilina e eosina - HE (ROMEIS, 1968) e da violeta cresil (MARTOJA; MARTOJA-PIERSON, 1970).

Para a técnica da HE, as secções foram submetidas a um processo de hidratação, passando em uma série decrescente de álcoois (100%, 95%, 90%, 80%, 70% e 50%), onde permaneceram por 2 minutos em cada álcool e, posteriormente mantidas por um período de 5 minutos em água destilada. Em seguida, as secções foram imersas em solução de hematoxilina durante 5 minutos, lavadas por mais 5 minutos em água destilada, e imersas por 1 minuto em solução de eosina. Após nova lavagem em água destilada por 5 minutos, as secções foram desidratadas em série crescente de álcoois (do 50% ao 100%) por 2 minutos cada, diafanizadas em xilol (3 x 2 minutos) e montadas com Entellan⁷, entre lâmina e lamínula.

O processo de hidratação das secções submetidas à técnica da violeta cresil, foi o mesmo utilizado na metodologia da HE. Após hidratadas, as secções foram imersas na solução de violeta cresil durante 60 min. em estufa a 37°C e, então, lavadas por 5 minutos em água destilada. A desidratação e a montagem dos espécimes foram as mesmas empregadas na técnica da HE.

4.7.2 Marcação dos neurônios corticais nitrérgicos através da reação histoquímica da β -Nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d)

Para esta técnica histoquímica, realizada de acordo com o preconizado por Scherer-Singler (1983), Santer (1994) e Albuquerque Júnior (2008), as secções foram imersas por um período de 30 minutos em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em solução tampão fosfato (PBS- 0,1M pH 7,4) e, em seguida, mantidas por 10 minutos em solução de 0,3% de Triton X-100⁸ em PBS. Após 3 lavagens em PBS durante 10 minutos, os espécimes foram imersos por um período de 24 horas no seguinte meio de incubação: 0,008 g de Nitro-Blue Tetrazolium⁹, 0,07 g de β -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato na forma reduzida¹⁰, em 100 ml PBS à 37° C. A reação foi interrompida com a imersão das secções em solução

⁷ Merck, Darmstadt, Alemanha

⁸ Sigma, St.Louis, EUA

⁹ NBT, N-6876; Sigma, St.Louis, EUA

¹⁰ β -NADPH-d, N-7505; Sigma, St.Louis, EUA

fixadora de paraformaldeído a 4% em PBS e, posteriormente, montados com solução de glicerina (70%), entre lâmina e lamínula.

4.7.3 Métodos histomorfométricos

A partir da secção coronal realizada no encéfalo, utilizou-se a técnica histológica da violeta cresil (Nissl) para os métodos histomorfométricos. A figura 16 ilustra uma secção histológica do encéfalo de um animal do grupo controle (nutrido = N60), sendo a mesma sobreposta pela imagem oriunda do atlas de Paxinos e Watson (2007), delimitando, desta forma, com toda área cortical. A partir desta padronização, foram realizadas as avaliações histomorfométricas que se seguem:

Figura 16 - Secção coronal do encéfalo de um animal do grupo controle (N60) com delimitação da área cortical

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012) e (PAXINOS; WATSON, 2007)

Legenda: Fotografia da preparação histológica através da técnica da violeta cresil sob lupa estereoscópica¹¹, acoplada a uma câmera digital, sobreposta pelo esquema da secção coronal do encéfalo de rato, correspondente ao corte Bregma diferenciando as áreas corticais.

¹¹ Carl Zeiss Microimaging modelo Stemi SV6, Göttingen, Alemanha

4.7.3.1 Determinação da espessura do córtex cerebral (*e.c*)

Nas secções de cada hemisfério cerebral, foram tomadas cinco medidas (em μm) da *e.c.* equidistantes entre si, com o uso de um sistema de imagem computadorizada¹², com objetiva de 5X. As medidas foram realizadas desde a região mais superficial da lâmina molecular, até a parte mais profunda da lâmina multiforme, no limite com a substância branca (fibras do corpo caloso). Os resultados obtidos para todos os grupos (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) foram expressos em média ($\pm$ DP).

Figura 17 - Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o *software*

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Procedimento histomorfométrico para avaliação da espessura cortical dos animais de todos os grupos experimentais. Aumento: 5X. Técnica histológica utilizada: violeta cresil (Nissl).

¹² Carl Zeiss Microimaging, modelo Axioshop 40 e câmera AxioCam ligados ao software Axiovision Rel. 4.6, Göttingen, Alemanha

4.7.3.2 Determinação do número de neurônios (n/a), da densidade de volume neuronal (V_v) e da área dos perfil celular dos corpos neuronais corticais ($a.c$)

Para avaliação desses parâmetros determinados nas lâminas coradas pelo método do violeta cresil, estabeleceu-se inicialmente a quantidade de “campos de quantificação” passíveis de serem analisados por métodos estatísticos, a partir de um estudo piloto, como preconizado por Gundersen (1986), Gundersen e Jensen (1987), Gundersen et al. (1999) e Howard e Reed (2005). A escolha dos campos foi determinada de forma aleatória, utilizando-se uma tabela de números randômicos (anexo A). O exemplo a seguir, foi aplicado a todos os animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Figura 18 - Campos de quantificação

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Esquema da seleção de campos para as quantificações histológicas

Inicialmente, as imagens de todos os campos foram adquiridas através de um sistema de imagem computadorizada (item 4.5.3.1), com objetiva de 100X utilizada com óleo de imersão. Os parâmetros n/a , V_v e $a.n$ foram determinados em uma mesma imagem, utilizando-se sistemas testes específicos (Anexos B, C), alocados sobre as imagens na tela do computador, de modo sistemático e uniforme. Essas avaliações foram realizadas em todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60), considerando-se como única as lâminas granulares externa e interna, pela semelhança na morfologia e no tamanho dos corpos neuronais. A fim de caracterizar o córtex cerebral como um todo, realizou-se uma média única para todos os parâmetros, a partir das médias de cada lâmina cortical. Os resultados foram apresentados em forma de média ($\pm$ DP).

4.7.3.2.1 Número de neurônios corticais por unidade de área (n/a)

Nos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60), para a determinação do n/a das lâminas corticais (granular, piramidal externa, piramidal interna e multiforme) e do córtex de uma forma geral, utilizou-se um sistema teste formado por linhas de inclusão e exclusão (Anexo C), sistemática e uniformemente alocado sobre as imagens na tela do computador, como descrito anteriormente.

Conforme ilustra a figura 19, todos os neurônios que tocavam a linha de inclusão (verde) foram contados, assim como aqueles que se encontravam dentro do sistema teste e que não tocavam a linha de exclusão (vermelha), e também que não se encontravam dentro da área delimitada, mas que tocavam a linha verde. Os resultados (em μm) foram apresentados sob a forma de média ($\pm$ DP).

Figura 19 - Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o *software*

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Procedimento mostrando o sistema teste com linhas de inclusão e exclusão limitando a área de contagem dos neurônios corticais. Aumento: 100X. Técnica histológica utilizada: violeta cresil (Nissl).

4.7.3.2.2 Densidade de volume dos neurônios corticais (V_v)

Esse parâmetro (V_v), que expressa a fração do volume ocupado pela estrutura de interesse, em relação ao volume total (volume referência) foi determinado nas imagens das lâminas corticais (granular, piramidal externa, piramidal interna e multiforme), e também no córtex de uma forma geral. Para tanto, foi utilizado um sistema teste composto por pontos equidistantes 1,5 cm entre si (Anexo B), sobre o qual se aplicou o sistema teste formado por linhas de inclusão e exclusão, acima descrito (Anexo C).

Desta forma, como verifica-se na figura 20, foram contados os pontos contidos no espaço referência (pontos pretos) e aqueles que tocavam os neurônios (pontos amarelos). A seguir, estabeleceu-se uma porcentagem representativa de neurônios, dividindo-se o número de pontos amarelos pelo número de pontos pretos.

Figura 20 - Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o sistema teste limitando a área para cálculo da densidade de volume dos neurônios corticais

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Procedimento mostrando a metodologia de quantificação dos pontos. Pontos que tocam os neurônios (**amarelos**), pontos do espaço referência (**pretos**) Aumento: 100X. Técnica histológica utilizada: violeta cresil (Nissl).

Em seguida, de acordo com Delesse (1847), Rosiwal (1898) e Thompson (1930), a seguinte equação foi utilizada:

$$V_v = \sum p_{(\text{estrutura de interesse})} / \sum P_{(\text{espaço referência})}$$

Onde:

p = número total de pontos que tocam a estrutura de interesse;

P = número total de pontos no espaço referência.

Esta estimativa do V_v que varia de 0 a 1, é transformada em porcentagem, multiplicando-se o resultado por 100 (HOWARD; REED, 2005). Os resultados foram expressos sob a forma de média ($\pm$ DP).

4.7.3.2.3 Área do perfil celular dos corpos neuronais corticais (**a.c**)

Para a mensuração da área dos neurônios (**a.c**) das lâminas corticais (granular, piramidal externa, piramidal interna e multiforme) e do córtex de uma forma geral, utilizou-se o mesmo sistema teste (Anexo C) e também o mesmo critério adotado no item 4.7.3.2.1 (Figura 21).

Com isso, foi possível estabelecer-se nos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60), não somente as médias ($\pm$ DP), mas também a distribuição das frequências (em %) das áreas dos neurônios correspondentes às lâminas corticais (granular, piramidal externa, piramidal interna e multiforme), expressas sob a forma de histogramas.

4.7.3.3 Determinação da área dos perfil celular dos corpos neuronais nitrérgicos (**a.n**)

Como os neurônios NADPH-d reativos - ou nitrérgicos – eram esparsos no córtex, não foi necessária a utilização de um sistema teste para selecioná-los (figura 22), a fim de determinar-lhes a **a.n**. Ainda, os mesmos foram avaliados somente no córtex, de uma forma geral, ou seja, não foram avaliados quanto às lâminas corticais.

Figura 21 - Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o *software*

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Procedimento mostrando o sistema teste com linhas de inclusão e exclusão limitando a área para escolha dos neurônios corticais que tiveram suas áreas avaliadas. Aumento: 100X. Técnica histológica utilizada: violeta cresil (Nissl).

Com isso, como para os neurônios corticais evidenciados pelo método da violeta cresil, foi possível estabelecer-se nos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60), não somente as médias ($\pm$ DP), mas também a distribuição das frequências (em %) das áreas dos neurônios nitrérgicos, expressas sob a forma de histogramas.

Figura 22 - Fotografia do monitor do computador, utilizando-se o *software*

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Procedimento mostrando os neurônios nitrérgicos corticais que tiveram suas áreas avaliadas. Aumento: 100X. Técnica histoquímica utilizada: NADPH-d

4.8 Tratamento estatístico

A análise estatística foi realizada levando em consideração os princípios de amostragem sistemática e uniformemente aleatória (GUNDERSEN et al, 1999), onde para as variáveis que apresentaram distribuição simétrica e com igualdade de variância (homocedasticidade), empregou-se a análise de variância ANOVA com dois fatores (dieta e idade) seguida por comparações múltiplas pelo método de *Tukey*, quando necessário. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% (ZAR, 1984), ou seja, valores foram considerados como significativos quando a probabilidade e índice de significância (p) foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

Para as avaliações relativas aos dados metabólicos, através da comparação das diferenças entre os grupos experimentais, foi utilizado ANOVA com dois fatores (dieta e período II e III), seguida por comparações múltiplas pelo teste *post hoc* de *Bonferroni* para comparação das médias. O nível de significância foi mantido em 5% ($p < 0,05$) em todos os casos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir das análises **qualitativas** e **quantitativas** foram apresentados através de tabelas (com médias $\pm$ DP), gráficos e figuras, ordenados de acordo com os aspectos **macroscópicos** e **microscópicos**.

5.1 Aspectos macroscópicos

Neste item serão apresentados, para todos os grupos experimentais, os resultados referentes às **características corpóreas gerais e encefálicas**.

5.1.1 Aspectos macroscópicos qualitativos

Com a utilização deste protocolo e do monitoramento em gaiolas metabólicas, foram observadas algumas diferenças físicas e comportamentais entre os animais dos grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Assim, desde o início dos experimentos, quando da formação dos grupos básicos nutrido (N) e subnutrido (S), verificou-se que as ninhadas foram mais numerosas nestes, do que naqueles, ou seja, de 9 a 14 filhotes no grupo S, e entre 5 a 11 filhotes no grupo N. Em geral, os processos de aparecimento da lanugem, descolamento das orelhas e abertura dos olhos que ocorrem, em média, respectivamente nos dias 3, 7 e 12 de vida pós-natal nos animais do grupo N, foram observados pelo menos um dia mais tarde nos animais do grupo S.

Esse atraso também foi detectado quando do estabelecimento da pelagem, fenômeno que ocorre por volta do 7º dia de vida pós-natal. Os animais S caracterizaram-se por apresentar pelos de distribuição escassa, curtos e menos vistosos, não raro exibindo áreas com alopecia. Quanto a esses aspectos, os animais submetidos à recuperação protéica (Rp42 e Rt60) demonstraram restauro da pelagem e preenchimento parcial das áreas de alopecia, porém, com densidade ainda abaixo daquela verificada nos respectivos grupos controle (N42 e N60).

Aglomerados após o nascimento, os filhotes dos grupos N e S exibiram diferenças significativas, quando se avaliou a atividade de locomoção no ambiente da caixa. Desta forma, em torno de 15 dias de vida, verificou-se que os animais N locomoviam-se e alimentavam-se livremente e de maneira independente, ou seja, nesta fase, além do leite materno, também já se alimentavam da dieta oferecida às matrizes. Este processo foi detectado nos animais S mais tardiamente, numa fase muito próxima ao período do desmame (21 dias). Todavia, após o desmame, os animais dos grupos S42 e S60 desenvolveram um processo de hiperatividade que se prolongou até a fase mais tardia do experimento (60 dias), o que não foi detectado nos demais grupos experimentais (N42 e N60; Rp42 e Rt60). É interessante ressaltar que, com a administração da dieta normoprotéica para o grupo S a partir do 22º dia de vida pós-natal (constituindo-se o grupo Rp42), estes passavam a exibir um comportamento semelhante aos dos grupos N42 e N60.

A taxa de natimortos e de morte pós-natal foi elevada nos animais do grupo S; fenômeno raramente observado nos animais constituintes do grupo N. Ainda, somente no grupo S é que se observou o ato de canibalismo, praticado tanto entre a mãe com os filhotes, como entre os filhotes.

Relativamente aos períodos de monitoramento I, II e III nas gaiolas metabólicas, os animais dos grupos N42 e N60 exibiram um comportamento equilibrado e constante, não diferente daquele observado quando no ambiente da caixa. Já aqueles dos grupos S42 e S60, bem como os dos grupos Rp42 e Rt60, por vezes encontravam-se ativos e reativos numa tentativa de escapar da manipulação, e em outras, tornavam-se hipoativos e letárgicos.

Particularmente, em relação aos animais subnutridos, não era difícil encontra-los recolhidos no recipiente de ração da gaiola metabólica, local possivelmente mais confortável, visto o tamanho reduzido desses animais, comparativamente aos dos demais grupos (N42 e N60; Rp42 e Rt60). Aliás, quanto a esse aspecto, deve-se aqui salientar essa diferença quanto ao tamanho corporal dos animais subnutridos, aproximadamente a metade do tamanho observado nos animais nutridos e renutridos (Figura 23).

Nesses períodos de monitoramento, chamou a atenção, o aspecto das fezes dos animais do grupo Rp42 na fase I e do grupo Rt60 na fase II, caracterizada por apresentar-se pastosa e muitas vezes aderida às paredes do coletor. Essa característica não foi observada em nenhum dos três períodos, nos animais dos grupos N (42 e 60) e S (42 e 60).

Relativamente aos animais submetidos à renutrição após o 43º dia (grupo Rt60), estes até 42 dias (fase II), apresentaram em comparação ao grupo controle (N42), aspecto corporal (tamanho reduzido) e comportamental muito parecido ao verificado para o grupo S42. O aspecto pastoso das fezes também foi uma característica evidente, como previamente descrito para os animais do grupo Rp42.

Durante os procedimentos prévios à retirada do encéfalo, ao final dos 42 dias e 60 dias do período experimental, observou-se nos animais do grupo S (42 e 60) uma pele relativamente delgada, facilitando assim, o processo de exposição da calota craniana e do arco zigomático. Também, foi facilitada a exposição e retirada do encéfalo através da osteotomia na face dorsal do crânio, comparativamente aos demais animais (N42 e N60; Rp42 e Rt60), estes com ossos mais espessos e, portanto, oferecendo maior resistência. Tal aspecto também aplica-se ao se dissecar a dura-máter, muito delgada nos animais subnutridos. Quanto aos aspectos macroscópicos, muito embora os encéfalos dos animais S (42 e 60) exibissem sulcos menos pronunciados quando comparados, respectivamente, aos animais N (42 e 60) e R (Rp42 e Rt60) não foram detectadas diferenças significativas entre os animais de todos os grupos quanto aos aspectos de coloração, consistência e textura do encéfalo (Figura 24).

Fato digno de nota foi observado durante a dissecação dos animais do grupo N60, os quais apresentaram urolitíase, tanto renal quanto vesical. Chamou-nos a atenção o aspecto da urina destes animais, uma vez que, em alguns momentos apresentou-se escurecida e vestígios de sangue foram observados em algumas partes da gaiola metabólica, sem que os animais apresentassem qualquer ferimento.

Figura 23 - Comprimento dos animais dos grupos experimentais

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Observar, de cima para baixo, o comprimento dos animais de todos os grupos experimentais. N60 e N42; Rt60 e Rp42; S60 e S42.

Figura 24 - Encéfalos utilizados nos procedimentos experimentais

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Encéfalos obtidos a partir dos animais de todos os grupos experimentais. Fileira superior: N42 e N60; Fileira média: Rp42 e Rt60; Fileira inferior: S42 e S60.

5.1.2 Aspectos macroscópicos quantitativos

Neste item serão descritos para todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60), os dados referentes às comparações estatísticas entre as médias ($\pm$ DP) dos seguintes parâmetros: **pesos corporais; peso encefálico; razão peso encefálico/peso corporal; comprimento naso-anal; circunferência abdominal; índice de Lee** e as **avaliações metabólicas**.

5.1.2.1 Pesos: corporais e encefálico

A tabela 1 e a figura 25 ilustram os dados referentes aos **pesos corporais** obtidos nos períodos ao nascimento (**Pn**) e no desmame (**Pd**).

Tabela 1 - Média ($\pm$ DP) dos pesos corporais (g) obtidos nos períodos do nascimento e do desmame dos animais dos grupos básicos nutridos (N) e subnutridos (S) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.

Parâmetros	Nutridos	Subnutridos
Pn (g)	6,46 $\pm$ 0,12	5,32 $\pm$ 0,03
Pd (g)	57,89 $\pm$ 3,32	25,68 $\pm$ 1,79

Figura 25 - Representação gráfica dos pesos corporais nos momentos do nascimento e do desmame

S $\neq$ N, $p < 0,001$

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

S $\neq$ N, $p < 0,001$

Legenda: Média $\pm$ DP dos pesos corporais (g) obtidos nos períodos do nascimento e do desmame dos animais dos grupos básicos nutridos (N) e subnutridos (S).

Relativamente aos dados de **Pn** e **Pd**, verificaram-se diferenças estatisticamente significante entre os grupos básicos. Assim, o **Pn** dos animais do grupo S foi, em média, 82,4% daquele observado para os animais do grupo N, enquanto que o **Pd** dos animais do grupo S representou 44,4% do obtido para os animais do grupo N, ou seja, do nascimento até o desmame, observou-se um marcante atraso no desenvolvimento do ganho de peso nos animais do grupo S.

A tabela 2 e as figuras 26 e 27 ilustram os dados referentes aos pesos corporais no momento da eutanásia (**Pet**), os pesos encefálicos (**Pe**) e a razão *peso encefálico/peso corporal* (**Pe/Pet**).

Tabela 2 - Média ($\pm$ DP) dos pesos corporais (g) no momento da eutanásia, os pesos encefálicos (g) e a razão *peso encefálico/peso corporal* dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.

Parâmetro	N42	S42	Rp42	N60	S60	Rt60
Pet (g)	231,55 $\pm$ 12,48	38,13 $\pm$ 6,01	110,47 $\pm$ 18,28	287,26 $\pm$ 16,81	50,79 $\pm$ 12,56	115,86 $\pm$ 4,26
Pe (g)	1,61 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,11	1,53 $\pm$ 0,05	1,62 $\pm$ 0,05	1,37 $\pm$ 0,05	1,50 $\pm$ 0,06
Pe/Pet	0,007 $\pm$ 0,0004	0,033 $\pm$ 0,0081	0,014 $\pm$ 0,0028	0,006 $\pm$ 0,0003	0,029 $\pm$ 0,0087	0,013 $\pm$ 0,0006

Figura 26 - Representação gráfica do peso corporal no momento da eutanásia

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP do peso corporal (g) obtidos no período da eutanásia dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Figura 27 - Representação gráfica do peso encefálico e da razão *peso encefálico/peso corporal* 42d (S ≠ N, $p < 0,05$)42d ≠ 60d (S) $p < 0,05$ (S ≠ R ≠ N, $p < 0,05$)42d ≠ 60d (N, S, R) $p = 0,026$ 42d (S ≠ R, $p < 0,05$)60d (S ≠ N, $p < 0,05$)60d (S ≠ R, $p < 0,05$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média ± DP do peso encefálico (g) e da razão *peso encefálico/peso corporal* dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Diferenças estatisticamente significante também foram detectadas entre os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60), quando se analisou os dados referentes ao **Pet**. Comparando-se com os animais dos grupos N42 e N60, os animais dos grupos S42 e S60 apresentaram, em média, 16,5 e 17,7% do peso corporal, respectivamente. Muito embora os dados do **Pet** dos animais dos grupos Rp42 e Rt60 tenham sido maiores do que o verificado para os correspondentes grupos subnutridos (S42 e S60), estes foram apenas 47,7% e 40,3% do observado para os seus respectivos controles (N42 = 231,55 e N60 = 287,26).

Quando se comparou o fator **idade** (42 e 60 dias), o **Pet** aumentou de maneira significativa apenas entre os animais do grupo controle (N).

O **Pe** seguiu o mesmo padrão de distribuição do peso corporal, sendo maior nos animais dos grupos N42 e N60, comparativamente ao dos demais grupos experimentais. Esse parâmetro, avaliado nos animais dos grupos Rp42 e Rt60, foi maior do que o determinado para os animais dos grupos S42 e S60. Estatisticamente, o **Pe** dos animais dos grupos S42 e S60 representaram, respectivamente, 76,4% e 84,6% daquele determinado para os grupos N42 e N60. Já nos animais dos grupos Rp42 e Rt60, esse parâmetro correspondeu a 95% e 92,6% do observado para os respectivos controles (N42 e N60) sendo, portanto, sob o aspecto estatístico, maiores do que o exibido para os correspondentes grupos subnutridos (S42 e S60).

Quanto aos diferentes grupos (N, S e R), a comparação do fator **idade** (42 e 60) não exibiu diferenças significantes para os animais nutridos e renutridos, tal parâmetro, entre os

animais subnutridos, foi maior no grupo de 60 dias; entretanto, os **Pe** desses animais foram menores do que o verificado para os demais grupos (N42 e N60; Rp42 e Rt60).

Considerando a razão **Pe/Pet**, esta foi consideravelmente maior nos animais dos grupos S42 e S60, sendo que, os animais dos grupos N42 e N60 apresentaram as menores médias. Para os animais dos grupos Rp42 e Rt60, estes possuem médias ainda maiores que aquelas observadas para os animais dos grupos N42 e N60, apresentando diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$).

É interessante ressaltar, que não houve uma acentuada diminuição no **Pe** dos animais dos grupos S42 e S60, comparativamente ao observado para o seu **Pet**. Portanto, enquanto o **Pet** dos animais do grupo S foi, em média, 16,5 e 17,7% daquele observado para os animais do grupo N de 42 e 60 dias respectivamente, o seu **Pe** apresentou-se, em média, 76,4% (42 dias) e 84,6% (60 dias) do peso dos animais N42 e N60.

Muito embora os **Pet** dos animais dos grupos Rp42 e Rt60 tenham se apresentado menores do que os **Pet** dos respectivos controles (N42 e N60), o mesmo não se observou ao se avaliar o **Pe**; ou seja, os grupos nutridos e renutridos não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

5.1.2.2 Comprimento naso-anal (**n-a**) e circunferência abdominal(**c-a**)

Os dados referentes ao parâmetro **n-a** e **c-a** estão expressos na tabela 3 e figura 28.

Tabela 3 - Média ($\pm$ DP) do comprimento naso-anal (cm) e da circunferência abdominal (cm) no momento da eutanásia dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.

Parâmetros	N42	S42	Rp42	N60	S60	Rt60
n-a (cm)	18,06 $\pm$ 0,83	11 $\pm$ 0,5	16 $\pm$ 0,61	22,4 $\pm$ 0,65	11,7 $\pm$ 0,84	16,4 $\pm$ 0,42
c-a (cm)	13,34 $\pm$ 0,23	8,3 $\pm$ 0,27	12,3 $\pm$ 0,57	18,3 $\pm$ 0,76	8,7 $\pm$ 0,35	12,4 $\pm$ 0,42

Figura 28 - Representação gráfica do comprimento naso-anal e da circunferência abdominal

42d (S ≠ R ≠ N, $p < 0,05$) 42d ≠ 60d (N) $p < 0,05$ 42d (S ≠ R ≠ N, $p < 0,05$) 42d ≠ 60d (N) $p < 0,05$
 60d (S ≠ R ≠ N, $p < 0,05$) 60d (S ≠ R ≠ N, $p < 0,05$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média ± DP do comprimento naso-anal (cm) e da circunferência abdominal (cm) dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Verificou-se que, nos animais dos grupos S42 e S60 o **n-a** representou, respectivamente, 60,9% e 52,2% daquela determinada para os grupos N42 e N60. Nos animais dos grupos Rp42 e Rt60 os dados foram de 88,6% e 73,2% do observado para os respectivos controles (N42= 18,06 cm, e N60= 22,4 cm), ou seja, expressivamente maiores do que aqueles dos grupos S42 e S60.

Quanto ao parâmetro **c-a**, essa medida nos animais dos grupos S42 e S60 representou, respectivamente, 62,2% e 47,5% daquela determinada para os grupos N42 e N60. Esses valores mantiveram-se, nos grupos Rp42 e Rt60, cerca de 92,2% e 67,8% do observado para os respectivos controles (N42 e N60), demonstrando-se expressivamente maiores do que aquelas dos grupos S42 e S60.

Tanto para **n-a** como para **c-a**, quando se comparou o fator **idade** entre os grupos (42 e 60 dias), esses parâmetros aumentaram de maneira significativa apenas entre os animais do grupo controle (N).

5.1.2.3 Determinação do grau de adiposidade corporal: índice de Lee (**iL**)

Na tabela 4 e na figura 29, encontram-se os dados relativos ao **iL** para os animais nutridos (N) subnutridos (S) e renutridos (R), com idades de 42 e 60 dias.

Tabela 4 - Média ($\pm$ DP) do índice de Lee dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.

Parâmetro	N42	S42	Rp42	N60	S60	Rt60
iL	3,41 $\pm$ 0,18	3,06 $\pm$ 0,15	2,99 $\pm$ 0,16	2,94 $\pm$ 0,1	3,17 $\pm$ 0,48	2,97 $\pm$ 0,07

Figura 29 - Representação gráfica do índice de Lee

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP do índice de Lee dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Foram detectadas diferenças estatisticamente significantes no fator **idade** (42 e 60 dias) apenas nos animais dos grupos N e S, sendo que os animais nutridos exibiram um **iL** decrescente, enquanto os animais subnutridos caracterizaram-se por apresentar um **iL** crescente. Ao se examinar os animais dos grupos Rp42 e Rt60, não houve variação, nem tampouco diferença estatística significativa. Todavia, observou-se diferença entre os animais dos grupos N42 e N60, quando comparados aos animais dos demais grupos (S42 e S60) e (Rp42 e Rt60) no que concerne ao fator **dieta**. Ao se comparar os animais dos grupos Rp42 e Rt60 com os animais dos grupos S42 e S60, para esse parâmetro, não foi detectada diferença estatisticamente significativa.

5.1.2.4 Dimensões encefálicas

A tabela 5 e as figuras 30 e 31 ilustram os dados referentes às dimensões encefálicas relativas aos eixos rostro-caudal (**r/c**), látero-lateral (**l/l**), dorso-ventral (**d/v**) e circunferências encefálicas maior (**cema**) e menor (**ceme**).

Tabela 5 - Média ($\pm$ DP) dos dados referentes às dimensões encefálicas relativas aos eixos rostro-caudal (cm), látero-lateral (cm), dorso-ventral (cm) e circunferências encefálicas maior (cm) e menor (cm) dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012

Parâmetros	N42	S42	Rp42	N60	S60	Rt60
r/c (cm)	1,95 $\pm$ 0,05	1,77 $\pm$ 0,04	1,94 $\pm$ 0,04	2,02 $\pm$ 0,05	1,83 $\pm$ 0,04	1,96 $\pm$ 0,04
l/l (cm)	1,49 $\pm$ 0,02	1,4 $\pm$ 0	1,48 $\pm$ 0,04	1,54 $\pm$ 0,04	1,43 $\pm$ 0,03	1,47 $\pm$ 0,04
d/v (cm)	0,94 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,03
cema (cm)	5,06 $\pm$ 0,15	4,58 $\pm$ 0,17	4,96 $\pm$ 0,1	5,18 $\pm$ 0,13	4,7 $\pm$ 0,18	4,98 $\pm$ 0,12
ceme (cm)	4,08 $\pm$ 0,13	3,68 $\pm$ 0,11	3,98 $\pm$ 0,04	4,2 $\pm$ 0,12	3,78 $\pm$ 0,23	4,1 $\pm$ 0,07

Figura 30 - Representação gráfica dos eixos rostro-caudal, látero-lateral e dorso-ventral

(S $\neq$ N, $p < 0,001$)
(S $\neq$ R, $p < 0,001$)

42d $\neq$ 60d (N, S, R) $p = 0,19$

(S $\neq$ R $\neq$ N, $p < 0,001$)

42d (S $\neq$ N, $p < 0,05$)
42d (S $\neq$ R, $p < 0,05$)
60d (S $\neq$ N, $p < 0,05$)

42d $\neq$ 60d (S) $p < 0,005$

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP do eixo rostro-caudal (cm), látero-lateral (cm) e dorso-ventral (cm) dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Todos os eixos determinados nos animais dos grupos S42 e S60 (**r/c**; **l/l**; **d/v**) apresentaram as menores médias, enquanto as maiores foram aquelas dos animais dos grupos N42 e N60; médias intermediárias foram exibidas pelos animais dos grupos Rp42 e Rt60. Avaliando-se o fator **dieta**, também foram os animais dos grupos S42 e S60 que apresentaram as menores médias ao serem comparados aos demais grupos nutridos e renutridos. Todavia, quanto ao fator **idade**, esses animais exibiram médias menores aquelas dos demais grupos, apenas nos eixos **r/c** e **d/v**. Para o eixo **l/l**, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos de 42 e 60 dias.

Comparativamente aos animais dos grupos N42 e N60 no fator **dieta**, aqueles dos grupos Rp42 e Rt60 tiveram médias menores apenas no eixo **l/l**, podendo-se inferir que tanto o processo de recuperação protéica precoce como o tardio, permitiu o restabelecimento dos eixos **r/c** e **d/v**.

Os parâmetros **cema** e **ceme** foram estatisticamente menores nos animais dos grupos S42 e S60 quanto ao fator **dieta**, tanto quando se comparou com os grupos N42 e N60, como os grupos Rp42 e Rt60; porém, estes últimos não diferiram dos respectivos controles. Para o fator **idade** (42 e 60 dias), há um aumento significativo da **ceme** em todos os grupos experimentais (N, S e R), sugestivo de um crescimento encefálico (Figura 31).

Figura 31 - Representação gráfica das circunferências maior e menor do encéfalo

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média ± DP da circunferência maior (cm) e da circunferência menor (cm) dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

5.1.2.5 Avaliações metabólicas

A fim de se estabelecer uma relação entre o processo nutricional e as possíveis consequências para o córtex cerebral, bem como as características metabólicas que os animais manifestam decorrente desta intervenção, os parâmetros como peso corporal, ingestão alimentar (ração) e hídrica (água), bem como excreção de urina e fezes foram aqui avaliadas através do monitoramento quantitativo. Embora tenhamos realizado as avaliações metabólicas em todos os períodos I- entre o 22º e o 26º dias; II- entre o 38º e 46º dias; III- entre o 56º e 60º dias, apresentou-se aqui apenas os resultados dos períodos II e III para os animais de 60 dias, por ser o maior período experimental deste estudo, uma vez que não houve tempo hábil para finalizar as avaliações estatísticas daqueles de 42 dias.

As considerações a respeito do peso corporal não foram diferentes daquelas observadas no tópico 5.1.2.1, porém o tratamento estatístico foi o diferencial como esclarecido no item 4.8 de materiais e métodos, uma vez que privilegiou aqui o comportamento linear dos animais acerca da dieta utilizada e da sua evolução durante as duas principais fases do período experimental (períodos II e III) para os animais de 60 dias. Desta forma, utilizando-se o pós-teste *Bonferroni*, diferenças estatisticamente significante quanto ao peso corporal também foram detectadas entre os grupos experimentais (N60, S60 e Rt60).

Comparando-se, quanto ao fator **dieta**, os animais do grupo N60, manifestaram diferenças superiormente acentuadas em relação os animais do grupo S60 e Rt60, sendo estes últimos estatisticamente semelhantes no período II. Ao se analisar o período III, as diferenças entre os animais do grupo N60 mantiveram-se superiores em relação aos animais do grupo S60, sendo que aqueles do grupo Rt60 apresentaram um ligeiro crescimento dos valores para este parâmetro, diferenciando-os daqueles S60, porém o mesmo não alcança os valores de normalidade. Ao se avaliar somente o fator **período**, observou-se que de II para III, os animais do grupo Rt60 ganharam mais peso (68,57g), ou seja, 5 vezes maior, quando comparados aos animais do grupo S60 (13,22g), devido a substituição da dieta hipoprotéica pela normoprotéica.

A tabela 6 e a figura 32 ilustram os dados referentes aos pesos corporais dos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60, S60 e Rt60).

Tabela 6 - Média ($\pm$ DP) dos pesos corporais (g) de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Novembro de 2012.

Parâmetro	S60		N60		Rt60	
	II	III	II	III	II	III
Peso corporal (g)	37,28 $\pm 6,09$	50,50 $\pm 9,50$	214,90 $\pm 13,03$	274,17 $\pm 15,57$	34,82 $\pm 13,03$	103,39 $\pm 4,62$

Figura 32 - Representação gráfica do peso corporal de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)

N60 $\neq$ S60 ($p < 0,05$)
 N60 $\neq$ Rt60 ($p < 0,05$)
 S60 $\neq$ Rt60 (III) ($p < 0,05$)
 II $\neq$ III (N60, S60, Rt60) ($p < 0,05$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP do peso corporal (g) obtidos nos períodos II e III de acordo com as avaliações metabólicas dos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60; S60 e Rt60).

Quanto ao fator **dieta**, ao se avaliar a ingestão alimentar e hídrica, e a excreção de fezes e urina no período II, não foi observada diferenças significantes entre os animais dos grupos S60 e Rt60, exceto apenas para a ingestão hídrica a qual mostrou-se maior para os animais do grupo Rt60. Contudo ao se avaliar o período III, para todos os parâmetros aqui analisados, os animais do grupo N60 manifestaram diferenças estatisticamente significantes maiores em relação aos demais. Já os animais do grupo S60 apresentaram as menores médias, enquanto os animais do grupo Rt60, médias intermediárias diferindo daqueles subnutridos e nutridos. Ao se avaliar somente o fator **período**, da mesma forma como observado para o peso corporal, chamou-nos a atenção o fato de os animais do grupo Rt60, de II para III, aumentarem consideravelmente os valores para todos os parâmetros (ingestão alimentar e hídrica, e a excreção de fezes e urina) comparativamente aos demais (S60 e N60). Já os animais S60, de II para III, aumentaram os valores apenas para a excreção de urina, enquanto os animais N60 apresentaram aumento apenas para a ingestão alimentar.

A tabela 7 e as figuras 33 a 36 ilustram os dados referentes à ingestão alimentar e hídrica e à excreção de fezes e urina dos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60, S60 e Rt60).

Tabela 7 - Média ($\pm$ DP) referente à ingestão alimentar (g) e hídrica (ml) e à excreção de fezes (g) e urina (ml), de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Novembro de 2012.

Parâmetros	S60		N60		Rt60	
	II	III	II	III	II	III
Ingestão alimentar (g)	5,66 $\pm 1,070$	5,79 $\pm 1,22$	20,92 $\pm 1,58$	22,37 $\pm 0,69$	5,19 $\pm 0,92$	11,92 $\pm 1,06$
Ingestão hídrica (ml)	6,72 $\pm 1,57$	9,07 $\pm 3,52$	51,61 $\pm 5,76$	55,57 $\pm 8,03$	9,97 $\pm 1,99$	21,10 $\pm 5,27$
Excreção de fezes (g)	0,81 $\pm 0,22$	0,82 $\pm 0,28$	2,54 $\pm 0,46$	2,77 $\pm 0,57$	0,83 $\pm 0,03$	1,54 $\pm 0,22$
Excreção de urina (ml)	1,40 $\pm 0,48$	3,09 $\pm 1,55$	40,44 $\pm 6,24$	43,21 $\pm 8,10$	3,07 $\pm 1,81$	8,98 $\pm 3,28$

Figura 33 - Representação gráfica referente à ingestão alimentar de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)

N60 $\neq$ S60 ($p < 0,05$)
 N60 $\neq$ Rt60 ($p < 0,05$)
 S60 $\neq$ Rt60 (III) ($p < 0,05$)
 II $\neq$ III (N60, Rt60) ($p < 0,05$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP referente à ingestão alimentar (g) obtidos nos períodos II e III de acordo com as avaliações metabólicas dos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60; S60 e Rt60).

Figura 34 - Representação gráfica referente à ingestão hídrica de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)

$N60 \neq S60$ ($p < 0,05$)
 $N60 \neq Rt60$ ($p < 0,05$)
 $S60 \neq Rt60$ ($p < 0,05$)
 $II \neq III$ (Rt60) ($p < 0,05$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP referente à ingestão hídrica (ml) obtidos nos períodos II e III de acordo com as avaliações metabólicas dos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60; S60 e Rt60).

Figura 35 - Representação gráfica referente à excreção de fezes de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)

$N60 \neq S60$ ($p < 0,05$)
 $N60 \neq Rt60$ ($p < 0,05$)
 $S60 \neq Rt60$ (III) ($p < 0,05$)
 $II \neq III$ (Rt60) ($p < 0,05$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP referente à excreção de fezes (g) obtidos nos períodos II e III de acordo com as avaliações metabólicas dos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60; S60 e Rt60).

Figura 36 - Representação gráfica referente à excreção de urina de acordo com as avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)

N60 $\neq$ S60 ($p < 0,05$)
 N60 $\neq$ Rt60 ($p < 0,05$)
 S60 $\neq$ Rt60 (III) ($p < 0,05$)
 II $\neq$ III (S60, Rt60) ($p < 0,05$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP referente à excreção de urina (ml) obtidos nos períodos II e III de acordo com as avaliações metabólicas dos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60; S60 e Rt60).

A fim de se estabelecer comparações funcionais dos grupos aqui avaliados, perante os resultados metabólicos, foi realizada uma razão entre esses parâmetros analisados nos diferentes grupos N60, S60 e Rt60 e, estas informações podem ser observadas na tabela 8 e nas figuras 37 a 41.

Tabela 8 - Média ($\pm$ DP) razão entre: *ingestão alimentar/peso corporal*; *excreção de fezes/ingestão alimentar*; *ingestão hídrica/peso corporal*; *ingestão hídrica/ingestão alimentar*; *excreção de urina/ingestão hídrica*, relativa às avaliações metabólicas nos períodos II e III dos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Novembro de 2012.

Parâmetros	S60		N60		Rt60	
	II	III	II	III	II	III
Ingestão alimentar/Peso corporal	0,15 $\pm 0,15$	0,11 $\pm 0,15$	0,10 $\pm 0,05$	0,08 $\pm 0,03$	0,14 $\pm 0,11$	0,11 $\pm 0,06$
Excreção de fezes/Ingestão alimentar	0,15 $\pm 0,02$	0,15 $\pm 0,03$	0,12 $\pm 0,01$	0,12 $\pm 0,02$	0,17 $\pm 0,04$	0,13 $\pm 0,01$
Ingestão hídrica/Peso corporal	0,17 $\pm 0,02$	0,17 $\pm 0,06$	0,23 $\pm 0,03$	0,20 $\pm 0,03$	0,27 $\pm 0,03$	0,20 $\pm 0,04$
Ingestão hídrica/Ingestão alimentar	1,26 $\pm 0,16$	1,69 $\pm 0,93$	2,48 $\pm 0,32$	2,49 $\pm 0,41$	1,93 $\pm 0,15$	1,78 $\pm 0,44$
Excreção de urina/Ingestão hídrica	0,20 $\pm 0,06$	0,32 $\pm 0,10$	0,78 $\pm 0,04$	0,77 $\pm 0,04$	0,26 $\pm 0,14$	0,43 $\pm 0,08$

Ao se avaliar a razão, *ingestão alimentar/peso corporal* verificou-se, quanto ao fator **dieta** que os animais dos grupos S60 e Rt60 exibiram valores elevados comparativamente aos animais do grupo N60. Quanto ao fator **período**, todos os grupos diferiram entre si.

Relativamente à razão *excreção de fezes/ingestão alimentar*, em ambos os fatores, **dieta** e **período**, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes.

Quanto à razão *ingestão hídrica/peso corporal*, referente ao fator **dieta**, os animais do grupo Rt60 destacaram-se daqueles subnutridos (S60) por apresentar as maiores médias. Já avaliando-se somente o fator **período**, todos os grupos diferiram entre si.

Quanto ao fator **dieta**, a razão *ingestão hídrica/ingestão alimentar*, foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos N60 e S60, independentemente do período avaliado, sendo os maiores valores observados para os animais nutridos. Para o fator **período** não foram detectadas diferenças significantes.

Houve uma semelhança entre os valores relativos à razão *excreção de urina/ingestão hídrica* entre grupos (S60 e Rt60) quanto ao fator **dieta**. Entretanto, chamou-nos a atenção, os elevados valores observados para os animais do grupo N60 diferenciando-os daqueles primeiros. Contudo, quanto ao fator **período**, não houve diferença significativa no grupo controle (N60).

Figura 37 - Representação gráfica referente à razão *ingestão alimentar/peso corporal* avaliada nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)

N60 $\neq$ S60 ($p < 0,001$)

N60 $\neq$ Rt60 ($p < 0,001$)

II $\neq$ III (N60, S60, Rt60) ($p < 0,001$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP referente à razão *ingestão alimentar/peso corporal* obtidos nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60; S60 e Rt60).

Figura 38 - Representação gráfica referente à razão *excreção de fezes/ingestão alimentar* avaliada nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP referente à razão *excreção de fezes/ingestão alimentar* obtidos nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60; S60 e Rt60).

Figura 39 - Representação gráfica referente à razão *ingestão hídrica/peso corporal* avaliada nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)

S60 $\neq$ Rt60 ($p=0,041$)

II $\neq$ III (N60, S60, Rt60) ($p=0,010$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP referente à razão *ingestão hídrica/peso corporal* obtidos nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60; S60 e Rt60).

Figura 40 - Representação gráfica referente à razão *ingestão hídrica/ingestão alimentar* avaliada nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)

N60 $\neq$ S60 ($p=0,002$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP referente à razão *ingestão hídrica/ingestão alimentar* obtidos nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60; S60 e Rt60).

Figura 41 - Representação gráfica referente à razão *excreção de urina/ingestão hídrica* avaliada nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais até 60 dias (N60; S60 e Rt60)

N60 $\neq$ S60 ($p<0,05$)

N60 $\neq$ Rt60 ($p<0,05$)

II $\neq$ III (S60, Rt60) ($p<0,05$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP referente à razão *excreção de urina/ingestão hídrica* obtidos nos períodos II e III nos animais dos grupos experimentais de 60 dias (N60; S60 e Rt60).

5.2 Aspectos histológicos

Neste item serão apresentados, para todos os grupos experimentais, os resultados qualitativos e quantitativos referentes às **características microscópicas do córtex cerebral**.

5.2.1 Aspectos histológicos qualitativos

Inicialmente, a partir de uma simples inspeção visual de secções coronais realizadas no encéfalo, mesmo sem o auxílio de lente/lupa, distinguem-se perfeitamente no córtex cerebral, as substâncias cinzenta e branca, bem como, o corpo caloso entre o córtex e as regiões subcorticais (Figura 42).

Ao se avaliar a espessura da camada cortical através da coloração de Nissl, notou-se espessuras variáveis de acordo com as diferentes áreas avaliadas, bem como, a redução da sua espessura como um todo, nos animais dos grupos S42 e S60. Aparentemente, não foram notadas diferenças marcantes relativas a esse aspecto, quando se comparou os animais dos grupos Rp42 e Rt60 com os correspondentes grupos N42 e N60 (Figura 43).

Figura 42 - Secção coronal do encéfalo de animal do grupo controle (N60)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Fotografia em secção coronal da preparação histológica através da técnica da violeta cresil (Nissl) sob lupa estereoscópica, acoplada a uma câmera digital evidenciando variação quanto a espessura cortical nas diferentes áreas corticais.

Figura 43 - Caracterização da espessura cortical

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Aspecto da espessura cortical dos animais de todos os grupos experimentais (nutridos: N42 e N60; subnutridos: S42 e S60; renutridos: Rp42 e Rt60). Técnica histológica: violeta cresil (Nissl). 5X

No que concerne ao aspecto da organização geral do córtex cerebral dos diferentes grupos experimentais, identificou-se com as técnicas da H.E (Figuras 44) e da violeta cresil (Nissl) (Figuras 45), corpos celulares de neurônios distribuídos em seis lâminas fundamentais, de limites não muito precisos entre si. Assim, com base nos tipos neuronais predominantes, de acordo com a forma e o tamanho dos seus corpos celulares, distinguiram-se em todos os grupos experimentais, desde a superfície até a profundidade, as lâminas molecular (I), granular externa (II), piramidal externa (III), granular interna (IV), piramidal interna (V) e

multiforme (VI). Deve-se aqui considerar que, nos limites inferiores das diferentes lâminas, a invasão de neurônios das camadas subjacentes, era uma característica geral.

Como aspecto principal da delgada **lâmina molecular (I)**, destacou-se a presença de poucos neurônios de aspecto fusiforme, dispersamente distribuídos.

Na **lâmina granular externa (II)**, foram encontrados neurônios com contornos arredondados, maiores do que aqueles da camada precedente e em grande quantidade, permitindo uma distinção precisa da mesma.

Caracterizaram a **lâmina piramidal externa (III)**, neurônios cônicos ou piramidais, pequenos e médios, com um prolongamento em seu ápice, orientado, preferencialmente no sentido da superfície cortical.

Na **lâmina granular interna (IV)**, assim como na lâmina II, predominaram neurônios com contornos arredondados, entremeados a algumas células piramidais. Porém, comparativamente à sua correspondente externa, há uma quantidade maior de neurônios, com tamanho menor de seus corpos celulares.

Os maiores neurônios foram detectados na **lâmina piramidal interna (V)**, onde além do predomínio da forma piramidal, muitas dessas células exibiram aspectos semelhantes aos encontrados nas lâminas granulares.

A camada mais profunda, a **lâmina multiforme (VI)**, apresentou como característica, uma ampla variedade de tamanhos e de formas neuronais. Assim, quanto ao tamanho do corpo celular, o maior predomínio foi o de neurônios pequenos e médios; relativamente ao formato do corpo celular, foram observadas células fusiformes, piramidais e ovais.

Cumpramos ressaltar, que com as técnicas histológicas aqui empregadas, foram destacados e estavam presentes em todas as lâminas corticais, núcleos isolados de células neurogliais. Entretanto, com o emprego da coloração de violeta cresil, observou-se os corpúsculos de Nissl (substância de Nissl) no citoplasma de todos os tipos de neurônios descritos (Figura 46).

Figura 44 - Aspecto geral da laminação do córtex cerebral em H.E

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: (A) e das lâminas corticais: molecular (B), granular externa (C), piramidal externa (D), granular interna (E), piramidal interna (F) e multiforme (G). Técnica de coloração histológica: **Hematoxilina e eosina**.

Figura 45 - Lâminas corticais em violeta cresil (Nissl)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: **A** - lâmina molecular (I), **B** - lâmina granular externa (II), **C** - lâmina piramidal externa (III), **D** - lâmina granular interna (IV), **E** - lâmina piramidal interna (V) e **F** - lâmina multiforme (VI). Técnica de coloração histológica: **violeta cresil**. 100X

Figura 46 – Constituintes típicos da lâmina piramidal interna

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: **Setas** indicam os grânulos dispersos no interior do citoplasma conhecidos como corpúsculos de Nissl. **Asterisco** indicam os longos dendritos apicais verticalmente ascendentes. As **cabeças de seta** indicam núcleo de células neurogliais. Técnica histológica: **Violeta cresil**. 100X

Os **neurônios nitrérgicos** foram detectados em todos os grupos (N42 e N60; S42 e S60: Rp42 e Rt60) distribuídos de maneira difusa por toda a área cortical, em menor quantidade e geralmente com reatividade intensa, sendo também observados aqueles pouco reativos (Figura 47). Basicamente, sua maior concentração estava nas lâminas II (granular externa) e VI (multiforme).

Figura 47 - Neurônios nitrérgicos de animal do grupo N60

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: **(A)** Neurônios evidenciando intensa reatividade à NADPH-d. **(B)** Neurônios evidenciando baixa reatividade à NADPH-d. Técnica histoquímica: NADPHd. 100X

5.2.2 Aspectos histológicos quantitativos

Neste item, em todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60), realizou-se comparações estatísticas entre as médias ($\pm$ DP) dos seguintes parâmetros: espessura cortical (**e.c**); número de neurônios/área (**n/a**); densidade de volume dos neurônios (**V_v**) e área dos neurônios (**a.n**) nas diferentes lâminas corticais (granular, piramidal externa, piramidal interna e multiforme).

Os dados referentes à **e.c** estão expressos na tabela 9 e na figura 48.

Tabela 9 - Média ($\pm$ DP) dos dados referentes à espessura cortical (μm) dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.

Parâmetro	N42	S42	Rp42	N60	S60	Rt60
e.c (μm)	1969 $\pm$ 95,15	1586 $\pm$ 61,08	11759 $\pm$ 212,27	2013 $\pm$ 94,31	1633 $\pm$ 127,97	1716 $\pm$ 122,17

Figura 48 - Representação gráfica da espessura cortical

(S $\neq$ N, $p < 0,001$)

(R $\neq$ N, $p < 0,001$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP da espessura cortical (μm) dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Assim, as médias da **e.c** foram maiores nos animais dos grupos nutridos (N42 e N60) e menores nos animais dos grupos subnutridos (S42 e S60); já os animais renutridos (Rp42 e Rt60) apresentaram médias intermediárias. Entretanto, tendo-se como referência os grupos N42 e N60, somente no fator **dieta**, os grupos S e R exibiram uma espessura menor, demonstrando que a renutrição precoce ou tardia, não foi capaz de promover a recuperação desse parâmetro.

A tabela 10 e as figuras 49 e 50 expressam os valores obtidos para o **n/a** em todos os grupos aqui avaliados.

Tabela 10 - Média ($\pm$ DP) dos dados referentes ao número de neurônios por unidade de área dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.

Parâmetros	N42	S42	Rp42	N60	S60	Rt60
n/a cortical	4,19 $\pm$ 0,27	4,27 $\pm$ 0,44	3,92 $\pm$ 0,53	3,41 $\pm$ 0,2	3,74 $\pm$ 0,6	3,71 $\pm$ 0,67
n/a granular	5,07 $\pm$ 0,65	4,87 $\pm$ 0,53	4,42 $\pm$ 1,11	3,64 $\pm$ 0,61	3,98 $\pm$ 0,73	3,96 $\pm$ 0,93
n/a piramidal e	3,96 $\pm$ 0,38	4,04 $\pm$ 0,76	3,50 $\pm$ 0,26	3,26 $\pm$ 0,30	3,31 $\pm$ 0,90	3,49 $\pm$ 0,82
n/a piramidal i	3,03 $\pm$ 0,45	3,24 $\pm$ 0,37	2,97 $\pm$ 0,61	2,46 $\pm$ 0,37	3,08 $\pm$ 0,55	3,01 $\pm$ 0,66
n/a multiforme	4,71 $\pm$ 0,52	4,94 $\pm$ 0,83	4,77 $\pm$ 1,06	4,28 $\pm$ 0,52	4,60 $\pm$ 1,01	4,42 $\pm$ 0,49

Figura 49 - Representação gráfica do n° de neurônios corticais por unidade de área

42d $\neq$ 60d (N, S, R) $p=0,007$

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP do número de neurônios corticais por unidade de área dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Para o fator **dieta**, foi possível verificar que a média de **n/a** no córtex cerebral não diferiu estatisticamente entre todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60). Ao se comparar o fator **idade** (42 e 60 dias) entre os grupos, através da análise

estatística, verificou-se diferença entre as médias de **n/a** em todos os grupos, demonstrando uma diminuição do número de neurônios com o avançar da idade.

O fator **n/a** também foi avaliado de acordo com as lâminas constituintes do córtex cerebral e esses dados podem ser observados na tabela 7 e na figura 50.

Figura 50 - Representação gráfica do n° de neurônios corticais por unidade de área relativas às lâminas corticais

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média ± DP do número de neurônios por área das lâminas corticais (granular, piramidal externa, piramidal interna e multiforme) dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

A análise desses dados permitiu verificar que, as médias de **n/a** não diferiram estatisticamente quando se comparou o fator **dieta**, dentro de cada grupo experimental (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) no que concerne às lâminas corticais granular, piramidais externa e interna e multiforme. Entretanto, ao se comparar essas médias ao fator **idade**, há uma diminuição de 42 para 60 dias, apenas nas lâminas granular e piramidal externa; nas demais lâminas não se detectaram diferenças estatísticas significantes.

A média de **V_v** no **córtex cerebral** não variou entre os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) considerando-se o fator **dieta**. Já no fator **idade**, houve uma

indicação de diferença estatística ($p=0,056$), independentemente se o animal era nutrido, subnutrido ou renutrido (Tabela 11 e Figura 51).

Tabela 11 - Média ($\pm$ DP) dos dados referentes à densidade de volume (%) dos neurônios dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.

arâmetros (%)	N42	S42	Rp42	N60	S60	Rt60
V_v cortical	29 $\pm$ 1	26 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2	26 $\pm$ 1	26 $\pm$ 4	25 $\pm$ 2
V_v granular	29 $\pm$ 4	25 $\pm$ 3	28 $\pm$ 1	24 $\pm$ 3	26 $\pm$ 4	24 $\pm$ 5
V_v piramidal e	28 $\pm$ 2	25 $\pm$ 2	26 $\pm$ 3	27 $\pm$ 1	24 $\pm$ 4	26 $\pm$ 3
V_v piramidal i	30 $\pm$ 4	29 $\pm$ 2	31 $\pm$ 4	28 $\pm$ 3	29 $\pm$ 5	28 $\pm$ 3
V_v multiforme	28 $\pm$ 2	26 $\pm$ 5	27 $\pm$ 3	26 $\pm$ 1	24 $\pm$ 4	23 $\pm$ 2

Figura 51 - Representação gráfica do V_v dos neurônios corticais

Existe indicação de diferença entre 42d e 60d (N, S, R) $p=0,056$

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP da densidade de volume (%) dos neurônios corticais dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

O parâmetro V_v, avaliado de acordo com as **lâminas corticais** (granular, piramidal externa e interna e multiforme) para o fator **dieta**, não exibiu diferença estatisticamente significativa quando se comparou todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60). Entretanto, de acordo com o fator **idade**, há uma diminuição progressiva de V_v (de 42 para 60 dias) apenas na lâmina multiforme para todos os grupos experimentais (Tabela 11 e Figura 52).

Figura 52 - Representação gráfica do V_v dos neurônios corticais relativos às lâminas corticais 42d $\neq$ 60d (N, S, R) $p=0,031$

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP da densidade de volume (%) das lâminas corticais (granular, piramidal externa, piramidal interna e multi-forme) dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

As médias das áreas dos neurônios (a.c) de toda a lâmina cortical apresentada pelos diferentes grupos experimentais estão expressas na tabela 12 e figura 53.

Tabela 12 - Média ($\pm$ DP) dos dados referentes a área (μm^2) dos neurônios dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.

Parâmetros	N42	S42	Rp42	N60	S60	Rt60
a.c cortical	176,5 $\pm$ 15,93	139,3 $\pm$ 10,09	163,1 $\pm$ 24,97	179,0 $\pm$ 9,66	141,4 $\pm$ 11,51	136,8 $\pm$ 14,75
a.c granular	138,5 $\pm$ 19,91	111,8 $\pm$ 7,31	136,8 $\pm$ 25,51	144,5 $\pm$ 10,41	119,9 $\pm$ 9,10	120,0 $\pm$ 20,76
a.c piramidal e	171,5 $\pm$ 12,69	137,2 $\pm$ 9,26	160,6 $\pm$ 21,98	176,2 $\pm$ 8,48	141,7 $\pm$ 12,41	134,1 $\pm$ 11,56
a.c piramidal i	263,8 $\pm$ 18,53	203,9 $\pm$ 18,27	240,3 $\pm$ 37,16	276,5 $\pm$ 37,72	205,1 $\pm$ 21,72	203,9 $\pm$ 26,07
a.c multi-forme	132,3 $\pm$ 12,25	104,3 $\pm$ 13,01	114,6 $\pm$ 17,44	118,8 $\pm$ 8,58	98,8 $\pm$ 6,29	89,2 $\pm$ 8,36

Figura 53 - Representação gráfica da área dos neurônios corticais

(S ≠ N, $p < 0,001$)(R ≠ N, $p < 0,001$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP da área (μm^2) dos neurônios corticais dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Relativamente ao fator **dieta**, as médias da **a.c** dos animais dos grupos S42 e S60 e Rp42 e Rt60 foram menores do que aquelas verificadas para os respectivos controles (N42 e N60); entre os grupos subnutrido e renutrido, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes. Ao se comparar as médias da **a.c**, de acordo com o fator **idade** (42 e 60), também não ocorreram diferenças entre todos os grupos.

De acordo com as **lâminas corticais** e o fator **dieta**, diferenças estatísticas nas médias da **a.c** entre os grupos foram observadas somente nas lâminas granular, piramidal interna e multiforme. Desta forma, nessas lâminas, os animais nutridos (N42 e N60) exibiram a maior média, os animais dos grupos S42 e S60 a menor média, e os animais renutridos (precoces - Rp42 e tardios - Rt60), uma média intermediária. Para a lâmina III (piramidal externa), a média de **a.c** foi menor nos animais dos grupos S, quando comparados aos animais dos grupos N. Entretanto, ao se comparar a **a.c** dentro do fator **idade**, houve diferença de 42 para 60 dias nas lâminas piramidal externa e multiforme, apenas nos animais dos grupos Rp42 e Rt60, que exibiram as menores médias (Tabela 12 e Figuras 54-56).

Figura 54 - Representação gráfica da área dos neurônios corticais relativos às lâminas corticais

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP da área (μm^2) dos neurônios das lâminas corticais (granular, piramidal externa, piramidal interna e multiforme) dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Figura 55 - Aspecto neuronal das lâminas corticais dos animais de 42 dias (N42, S42 e Rp42)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: (I) - lâmina molecular; (II) - lâmina granular externa; (III) - lâmina piramidal externa; (IV) - lâmina granular interna; (V) - lâmina piramidal interna; (VI) - lâmina multiforme.). Técnica de coloração histológica: **violeta cresil (Nissl)**. 100X

Figura 56 - Aspecto neuronal das lâminas corticais dos animais de 60 dias (N60, S60 e Rt60)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: (I) - lâmina molecular; (II) - lâmina granular externa; (III) - lâmina piramidal externa; (IV) - lâmina granular interna; (V) - lâmina piramidal interna; (VI) - lâmina multiforme. Técnica de coloração histológica: violeta cresil (Nissl). 100X

Nos histogramas da figura 57 estão expressas as distribuições das áreas do perfil dos neurônios corticais da **lâmina granular** dos animais dos grupos nutridos, subnutridos e renutridos.

Figura 57 - Representação gráfica da distribuição da área dos neurônios relativos à lâmina granular

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Histograma da distribuição das áreas do perfil dos neurônios corticais da lâmina granular dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Assim, nos grupos de 42 dias de idade, os animais nutridos (N42) apresentaram uma distribuição da área dos neurônios da **lâmina granular** entre 53,74 a 271,58 μm^2 , sendo que 75,8% dessas células estavam concentradas no intervalo de 90 e 150 μm^2 ; para os animais do grupo S42, a área dos neurônios variou entre 50,67 a 195,42 μm^2 , com uma a maior concentração em torno de 90 μm^2 (42,98%). Em relação aos animais do grupo Rp42, as áreas neuronais variaram entre 48,45 a 241,32 μm^2 , com 73,73% dos neurônios concentrando-se no intervalo entre 90 e 150 μm^2 .

Aos 60 dias de idade, os animais nutridos (N60), apresentaram área dos neurônios da lâmina granular entre 75,83 a 256,78 μm^2 , com 80,31% distribuídos no intervalo entre 90 e 150 μm^2 ; a área dos neurônios dos animais subnutridos (S60) variou de 61,7 a 219,61 μm^2 , com a maior concentração (42,01%) em torno de 90 μm^2 . Ao se analisar esse parâmetro para os animais renutridos (Rt60), a variação da área neuronal esteve entre 50 a 212,49 μm^2 , com 64,17% dos neurônios concentrados no intervalo entre 90 e 120 μm^2 .

Desta forma, para a **lâmina granular**, independente da idade, observou-se diferença estatisticamente significativa apenas entre os animais dos grupos S42 e S60, quando comparados aos animais dos grupos N42 e N60 ($p < 0,05$).

Na figura 58, verifica-se a distribuição das áreas do perfil dos neurônios corticais da **lâmina piramidal externa** dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Figura 58 - Representação gráfica da distribuição da área dos neurônios relativos à lâmina piramidal externa

42d ≠ 60d (R) $p < 0,05$

42d (S ≠ N, $p < 0,05$)

60d (S ≠ N, $p < 0,05$)

60d (R ≠ N, $p < 0,05$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Histograma da distribuição das áreas do perfil dos neurônios corticais da lâmina piramidal externa dos animais nutridos (N42 e N60); subnutridos (S42 e S60) e renutridos (Rp42 e Rt60).

Nos grupos de 42 dias de idade, a área dos neurônios da **lâmina piramidal externa** estava distribuída no intervalo entre 46,38 e 292,37 μm^2 nos animais nutridos (N42), sendo que 55,61% dos neurônios encontravam-se entre 150 e 180 μm^2 ; para os do grupo S42, a área dos neurônios variou entre 55,64 a 355,94 μm^2 , com a maior parte concentrada no intervalo entre 90 e 120 μm^2 (62,29%). Já para os animais do grupo Rp42, onde a distribuição das áreas variou de 63,05 a 304,81 μm^2 , foi no intervalo entre 120 e 180 μm^2 que se observou a maior concentração neuronal (68,95%).

Para os animais avaliados aos 60 dias de idade, aqueles do grupo N60 apresentaram área dos neurônios da **lâmina piramidal externa** entre 88,81 a 348,54 μm^2 , sendo que 75,84% dos neurônios encontraram-se entre 120 e 180 μm^2 . No grupo S60, a área dos neurônios variou entre 53,31 a 255,35 μm^2 , porém com uma alta concentração dos neurônios (75,7%) em um intervalo entre 90 e 150 μm^2 . Esse resultado foi muito semelhante ao verificado para os animais do grupo Rt60, que exibiram em torno de 77,84% dos seus neurônios também concentrados no intervalo entre 90 e 150 μm^2 , e distribuição das áreas entre 46,87 a 292,59 μm^2 .

Em linhas gerais, pode-se afirmar que, para a **lâmina piramidal externa**, existe diferença estatisticamente significativa dentro do fator **idade**, apenas entre os animais dos grupos Rp42 e Rt60. Todavia, quando se considera o fator **dieta**, aos 42 dias, os animais subnutridos diferem estatisticamente dos nutridos; aos 60 dias, os animais subnutridos e os renutridos tardiamente diferem dos nutridos ($p < 0,05$).

Na figura 59 estão expressas as distribuições das áreas do perfil dos neurônios corticais da **lâmina piramidal interna** dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Figura 59 - Representação gráfica da distribuição da área dos neurônios relativos à lâmina piramidal interna

(S ≠ N, $p < 0,05$)

(R ≠ N, $p < 0,05$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Histograma da distribuição das áreas do perfil dos neurônios corticais da lâmina piramidal interna dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Aos 42 dias, pode-se notar na **lâmina piramidal interna** que nos animais do grupo N42, as áreas variaram entre 51,69 a 643,35 μm², com 62,92% dos neurônios estabelecendo-se no intervalo entre 150 e 250 μm²; a área dos neurônios do grupo S42 variou de 61,72 a 458,61 μm², com uma concentração no intervalo entre 100 e 200 μm² (63,22%). Nos animais do grupo Rp42, cujas áreas variaram de 79,94 a 548,87 μm², foi naquele entre 150 e 250 μm² que se verificou a maior concentração neuronal (67%).

Ao se avaliar os grupos correspondentes a 60 dias de idade, os animais nutridos (N60), cujas áreas variaram de 92,8 a 601,33 μm², apresentaram 50% dos neurônios concentrados no intervalo 200 e 250 μm², enquanto que os animais subnutridos (S60), com áreas dispostas no

intervalo 65,86 a 612,13 μm^2 , tiveram cerca de 33,33% dos seus neurônios com área em torno de 150 μm^2 . Apesar da ampla variabilidade da área neuronal dos animais do grupo Rt60 (62,14 a 650,84 μm^2), uma grande porcentagem (73,09%) dessas células foi encontrada no intervalo entre 100 e 200 μm^2 .

Desta forma, independente da idade, para a **lâmina piramidal interna** foi detectada diferença estatisticamente significativa apenas entre os animais S (42 e 60) em comparação aos respectivos controles (N42 e N60), e entre estes últimos e aqueles dos grupos Rp42 e Rt60. ($p < 0,05$)

A área do perfil dos neurônios corticais da **lâmina multiforme** dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) estão expressas na figura 60.

Figura 60 - Representação gráfica da distribuição da área dos neurônios relativos à lâmina multiforme

42d $\neq$ 60d (N, S, R) $p=0,007$
 (S $\neq$ N, $p < 0,05$)
 (R $\neq$ N, $p < 0,05$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Histograma da distribuição das áreas do perfil dos neurônios corticais da lâmina multiforme dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Assim, para os animais de 42 dias de idade, as áreas dos neurônios da **lâmina multiforme** do grupo nutrido (N42) variaram de 49,52 a 242,58 μm^2 , com uma alta porcentagem (77,52%) dos neurônios entre 90 e 150 μm^2 . Para aqueles animais do grupo S42, a área dos neurônios, que variou entre 47,6 a 195,13 μm^2 , concentrou-se no intervalo restrito de 60 e 90 μm^2 (73,85%), sendo que a área da maior porcentagem dos neurônios do grupo Rp42 (39,34%) concentrou-se em torno de 90 μm^2 , muito embora a variação tenha sido de 46,93 a 202,57 μm^2 .

Na fase de 60 dias de idade, os animais do grupo N60 apresentaram as áreas neuronais distribuídas entre 59,61 a 277,67 μm^2 , com 69,18% dos neurônios concentrados no intervalo entre 90 e 120 μm^2 ; aqueles do grupo S60 exibiram uma variação de suas áreas entre 52,63 a 200,2 μm^2 , porém, com elevada concentração dos neurônios (77,69%) entre 60 e 90 μm^2 . A variação das áreas neuronais dos animais do grupo Rt60 manteve-se no intervalo de 45,72 a 192,1 μm^2 , com 78,84% dessas células concentradas entre 60 e 90 μm^2 .

Para a **lâmina multiforme**, portanto, observa-se diferença estatisticamente significativa dentro do fator **idade** para todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60). Todavia, dentro do fator **dieta**, diferenças estatisticamente significantes foram detectadas ao se comparar os animais subnutridos (S) com os animais nutridos (N), e quando se comparou estes últimos, com os animais renutridos nas fases precoce (Rp42) e tardia (Rt60). ($p < 0,05$)

As médias das áreas dos neurônios nitrérgicos (**a.n**) corticais apresentadas pelos diferentes grupos experimentais estão expressas na tabela 13 e figura 61 e 62.

Tabela 13 - Média ($\pm$ DP) dos dados referentes a área (μm^2) dos neurônios nitrérgicos corticais dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) - São Paulo - 2009 a Junho de 2012.

Parâmetros	N42	S42	Rp42	N60	S60	Rt60
a.n	176,6 $\pm$ 13,3	143,5 $\pm$ 13,7	145,0 $\pm$ 18,3	174,8 $\pm$ 2,5	139,1 $\pm$ 14,3	145,1 $\pm$ 4,4

Figura 61 - Representação gráfica da área dos neurônios nitrérgicos corticais

(S $\neq$ N, $p < 0,001$)
(R $\neq$ N, $p < 0,001$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Média $\pm$ DP da área (μm^2) dos neurônios nitrérgicos corticais dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Relativamente ao fator **dieta**, as médias da **a.n** dos animais dos grupos S42 e S60 e Rp42 e Rt60 foram estatisticamente menores do que aquelas verificadas para os respectivos controles (N42 e N60); entre os grupos subnutrido e renutrido, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes. Ao se comparar as médias da **a.n**, de acordo com o fator **idade** (42 e 60), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos.

Figura 62 – Neurônios nitrérgicos

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Aspectos morfológicos dos neurônios nitrérgicos do córtex cerebral dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60, Rp42 e Rt60). Técnica histoquímica: NADPH-d. 100X

A distribuição das áreas do perfil dos neurônios nitrérgicos dos animais dos grupos nutridos, subnutridos e renutridos, estão expressas na figura 63.

Figura 63 - Representação gráfica da distribuição da área do perfil dos neurônios nitrérgicos

(S ≠ N, $p < 0,001$)(R ≠ N, $p < 0,001$)

Fonte: (BOLINA-MATOS, 2012)

Legenda: Histograma da distribuição das áreas do perfil dos neurônios nitrérgicos dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Através da análise dos histogramas verificou-se que, para os animais dos grupos de 42 dias de idade, os do grupo N42 apresentaram uma distribuição da área dos neurônios nitrérgicos corticais entre 82,8 a 371,4 μm^2 , sendo que 72,4% dessas células estavam concentradas no intervalo de 125 e 200 μm^2 ; para os animais do grupo S42, a área dos neurônios variou entre 33,38 a 270,9 μm^2 , porém a maior concentração foi observada em torno de 100 e 150 μm^2 (70,4%). Em relação aos animais do grupo Rp42, 57,6% dos neurônios concentraram-se no intervalo entre 100 e 150 μm^2 , com variação na distribuição entre 52,1 a 297,5 μm^2 .

Aos 60 dias de idade, os animais nutridos (N60), apresentaram área dos neurônios nitrérgicos corticais entre 85,9 a 362,4 μm^2 , com 64,4% distribuídos no intervalo entre 125 e 175 μm^2 ; a área dos neurônios dos animais subnutridos (S60) variou de 11,5 a 306,1 μm^2 , com a maior concentração (64,4%) em torno de 75 e 150 μm^2 . Ao se analisar esse parâmetro para os animais renutridos (Rt60), a variação da área neuronal esteve entre 58,6 a 265,9 μm^2 com 43,2% dos neurônios concentrados no intervalo entre 125 e 175 μm^2 .

Desta forma, para os neurônios nitrérgicos corticais, independente da idade, foram detectadas diferenças estatisticamente significantes apenas entre os animais S (42 e 60) em comparação aos respectivos controles (N42 e N60), e entre estes últimos e aqueles dos grupos Rp42 e Rt60, ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Dada a grande quantidade de informações decorrentes dos resultados aqui obtidos, com o intuito de facilitar a compreensão, optou-se pela exposição comparativa com a literatura pertinente em itens expostos a seguir.

6.1 Considerações sobre o modelo animal e experimental

A subnutrição é um problema mundial que afeta milhões de crianças em todo o mundo, principalmente, durante os estágios vulneráveis de desenvolvimento do sistema nervoso central, resultando em alterações estruturais, comportamentais, anormalidades na função cognitiva e distúrbios de aprendizado e memória (MORGANE et al., 2002).

Há evidências de que a disfunção cerebral causada pela subnutrição pode, em parte, ser irreversível. Assim, inúmeras pesquisas têm avançado no sentido de compreender melhor a importância da integridade do sistema nervoso para o seu funcionamento. Entre essas pesquisas, encontram-se aquelas que tentam identificar os mecanismos das injúrias, objetivando atenuar ou reverter, sempre que possível, as lesões resultantes das mesmas.

De acordo com Monteiro et al. (2009), muitos modelos animais têm sido utilizados em pesquisas, a fim de se descobrir mecanismos envolvidos em determinadas patologias. A partir de um levantamento feito de suas pesquisas, 78,3% utilizaram o rato como modelo experimental e, 21,7% destas utilizaram camundongos, porcos, ovelhas, entre outros.

Assim, foram utilizados neste estudo *Rattus norvegicus* machos, da linhagem Wistar Hannover e heterogênicos, ou seja, não consanguíneos (ou *outbred*), os quais de acordo com Andrade, Pinto e Oliveira (2002) e Braga (2010), são animais que apresentam, em sua constituição genética, uma alta heterozigose (90%), o que faz com que seja mantida, em uma mesma colônia, uma grande diversidade genética, possibilitando uma fiel reprodução de populações naturais.

Segundo Kistler et al. (1988) e Aksoy et al. (2002), muitos estudiosos usam animais de menor porte, como por exemplo, o rato da linhagem Wistar, pela facilidade na obtenção e manipulação experimental em laboratório, podendo-se acompanhar, muito proximamente, o desenvolvimento de qualquer patologia, permitindo que algumas características e/ou aspectos

clínicos, possam ser observados a olho desarmado. Além disso, esse modelo animal caracteriza-se pelo baixo índice de mortalidade, o que, de certa forma, diminui os custos relativos a uma pesquisa, onde um maior número de animais se faz necessário.

De uma forma geral, as justificativas para utilização do modelo animal são inúmeras. São animais dóceis e de pequeno porte, o que os torna mais econômicos tanto para a criação e quanto para a manutenção. Possuem uma alta taxa reprodutiva, ou seja, são bons reprodutores e geram muitos descendentes; além disso, apresentam um ciclo de vida curto, o que permite estudar o processo das injúrias em vários indivíduos e, em todas as fases do seu ciclo vital. Somando-se a isso, a genética desses animais é bastante conhecida demonstrando grande semelhança com aquele do humano (BRAGA, 2010).

Segundo Andrade, Pinto e Oliveira, (2002) e Viau et al. (2005), a puberdade nesses animais se dá a partir dos 30 dias e a maturidade sexual, dos 50 aos 60 dias de vida, sendo que estes permanecem em reprodução por até 9 meses de idade, possibilitando a obtenção das ninhadas de forma rápida e eficiente. Esta informação foi importante na escolha da melhor idade para o acasalamento dos animais utilizados no presente estudo. Optou-se, desta forma, por animais com idades entre 60 e 90 dias, objetivando-se uma maior sobrevivência da prole, principalmente considerando o grupo de animais subnutridos (S), os quais merecem mais atenção, devido seu debilitado estado nutricional e psicológico. Vale aqui ressaltar a dificuldade no acasalamento destes animais, comparativamente aos animais do grupo controle (N), onde estes últimos apresentaram maiores sucessos quanto ao número de fêmeas prenhas e de filhotes que sobrevivem.

Já é sabido que a subnutrição protéica ou protéica-calórica afeta os diferentes órgãos e sistemas, seja por comprometimento direto (na celularidade e na função) ou indireto (no crescimento e no desenvolvimento do organismo em geral), tanto em humanos quanto em modelos experimentais bem controlados (BEDI, 1991; CHANDRA, 1991; MONTE, 2000; BRANDÃO et al., 2003; GOMES et al., 2006). As pesquisas desenvolvidas utilizando os animais de laboratório são essenciais para estimar os efeitos potencialmente prejudiciais da subnutrição. Através dessas, podem ser estabelecidas relações entre a subnutrição precoce e alterações estruturais no encéfalo, bem como as possíveis consequências comportamentais e cognitivas (LEVITSKY; STRUPP, 1995).

Utilizando-se principalmente mamíferos inferiores, tais como os roedores, estudos clássicos dos neuritos do córtex cerebral conduziram ao reconhecimento de muitos tipos de neurônios. As conhecidas células piramidais oriundas de material corado pelo método de

Nissl foram, principalmente, individualizadas considerando o seu tamanho relativo em pequenas, médias e grandes (WILLIAMS et al., 1995).

A utilização de animais experimentais é fundamental para elaboração de protocolos de subnutrição. Em estudos neuroanatômicos de regiões encefálicas específicas, como o córtex cerebral e o hipocampo de animais submetidos à subnutrição precoce, têm confirmado as suspeitas de Winick e Noble (1966) e de Dobbing (1972) sobre a vulnerabilidade do sistema nervoso. Além disso, esses estudos têm fornecido maiores evidências relacionadas às alterações estruturais severas no SNC (MORGANE et al., 1978). Assim, em ratos, estruturas encefálicas que se desenvolvem após o nascimento, como o cérebro, o hipocampo e o cerebelo, estão mais susceptíveis às alterações, que podem persistir ao longo de toda a vida (LEVITSKY; STRUPP, 1995).

Portanto, para Nóbrega (1986), é importante considerar alguns fatores que podem interferir na correta interpretação dos resultados, por ocasião da transposição de um modelo experimental para humanos. Desta forma, a subnutrição imposta a animais de laboratório é geralmente mais intensa do que àquela encontrada em humanos, tornando as alterações orgânicas mais evidentes. Ainda, deve-se considerar as diferenças no período de desenvolvimento orgânico em função da espécie animal utilizada, principalmente no que diz respeito ao sistema nervoso (DOBBING, 1971; DOBBING; SANDS, 1979)¹³.

O rato, a cobaia, o porco e o macaco são os animais mais frequentemente utilizados para reprodução de um quadro de subnutrição, entretanto, admite-se que o porco e o macaco apresentam anorexia intensa quanto da carência de proteínas (KIRSCH; SAUNDERS; BROCK, 1968). Desta forma, segundo Nóbrega (1986), tal fato parece não ocorrer no rato, motivo pelo qual tem sido amplamente usado para reprodução de subnutrição experimental.

De acordo com Wigglesworth (1964), a subnutrição pré-natal tem sido estudada principalmente por intermédio de dois modelos experimentais: pela imposição de restrição protéica e/ou calórica, ou pela redução da circulação uterina na rata prenha através de um procedimento cirúrgico, realizando-se uma ligadura em um dos ramos da artéria uterina. No presente estudo optou-se pela restrição protéica, muito embora Nóbrega (1986) tenha relatado que neste último modelo, geralmente verifica-se maior preservação do sistema nervoso.

A utilização de um modelo experimental em que os animais são submetidos à subnutrição protéica severa, como o aqui utilizado, é apropriado, pois este é o principal tipo de subnutrição em países em desenvolvimento como o Brasil, dada a gama de alimentos ricos

¹³ Vide figura 5, p. 41

em carboidratos que passaram a fazer parte das dietas populacionais (MONTE, 2000; MONTEIRO, 1995), principalmente associado ao estilo de vida repleto de atribuições observado nos indivíduos das grandes metrópoles.

Dados recentes observados no mapa da fome, publicado pela *World Food Programme* (WFP, 2012), mostra aumento dos índices (5 a 14%) de subnutrição no Brasil, quando comparado à penúltima publicação, onde este era apenas de 5 a 9% (WFP, 2011). Somando-se a esse fato, este estudo torna-se relevante, uma vez que diversos autores têm utilizado protocolos experimentais semelhantes ao aqui aplicado (CASTELUCCI et al., 2002; BINOTTI, 2003; BOLDRINI, 2003; BRANDÃO et al., 2003; AKAMATSU, 2006; BAUTZ, 2006; GOMES et al., 2006; MIRANDA, 2006; OLIVEIRA, 2006, BAPTISTA, 2008; CAVALLI, 2010; HABACUQUE, 2010; GONÇALVES, 2011; LUIZ, 2011; VONO, 2011), diminuindo, assim, as chances de erros e desperdício de animais, bem como o de materiais.

Quanto à restrição protéica, observa-se grande variedade de modelos, não somente em relação às quantidades ofertadas, mas também na qualidade e no período gestacional em que esta restrição é imposta. No estudo de Ahmad e Rahman (1975), vários protocolos para subnutrição foram testados. Entre estes, os autores utilizaram um protocolo para avaliação quanto à disponibilidade de leite para a prole, de acordo com o número de filhotes variados para cada matriz e, ainda, levando-se em consideração o teor de proteína existente na dieta oferecida aos animais experimentais.

Desta forma, para este estudo, objetivou-se minimizar ao máximo os erros e grandes desvios padrões. Então, o protocolo utilizado para induzir uma subnutrição experimental, sendo esta apenas protéica e composta por 5% de proteína, a qual apresentava-se com porcentagem de calorias equilibradas¹⁴, era bem conhecido e já havia sido testado por vários pesquisadores como mencionado anteriormente. Ainda, especificamente no presente estudo, como as ninhadas eram numerosas, o número de filhotes mantidos com a matriz para aleitamento foi padronizado em seis, a fim de evitar discrepâncias nos pesos corporais e quanto à quantidade de leite oferecida aos animais. Além disso, esta redução objetivou-se evitar o elevado índice de mortalidade que acomete as ninhadas subnutridas, fenômeno este, devido à privação protéica e ao canibalismo.

Diversos trabalho sobre subnutrição protéica têm utilizado a caseína como a principal proteína a ser total ou parcialmente suprimida. A caseína (do latim "*caseus*", queijo) é uma fosfoproteína estrutural encontrada, com frequência, no leite de mamíferos (KUNZ;

¹⁴Vide figura 10, p. 58

LÖNNERDAL, 1990). Como objetivo deste estudo era causar uma subnutrição protéica experimental, utilizou-se dietas preparadas em laboratório especializado, contendo 5% de caseína, enquanto os controles e os tratados receberam 20% da mesma.

Sanz-Sampelayo, Fenolla e Extremera (1991) estudaram a retenção de proteína de acordo com a sua concentração e com a idade do animal. Estes constataram que a retenção de proteína é maior em animais com dieta constituída por 20% desta macromolécula, e que não há a necessidade de se utilizar ração contendo proteína acima de 17,5% para se obter o crescimento ideal dos animais. Partindo-se do pressuposto que o maior crescimento dos animais acontece até 60 dias (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; FUENTES et al., 2002; BRAGA, 2010), tais informações corroboram com os achados do presente estudo, uma vez que, ao se avaliar os animais adultos jovens do grupo nutrido (N60), por ocasião da dissecação, por vezes, foi encontrado litíase renal, fato este, não observado para nos animais dos demais grupos (N42; S42 e S60; Rp42 e Rt60).

Estas informações permitem inferir que esses animais, possivelmente, receberam excesso de proteína. Deste modo, após encerramento o período de crescimento do animal, há necessidade de se diminuir o teor de proteína da dieta oferecida. Assim, a dieta contendo 20% de caseína, é importante para o crescimento e desenvolvimento do animal durante as fases infantil e púbere até o início da fase adulta, contudo, esta mesma concentração protéica na idade adulta pode ser considerada hiperprotéica e, desta forma, gerar a retenção da proteína sobressalente causando injúrias.

Observou-se no presente estudo que, os animais renutridos, independentemente se precoce ou tardio, apresentaram fezes pastosas por ocasião da substituição da dieta hipoprotéica pela normoprotéica, sendo este fato, provavelmente, decorrente da readaptação alimentar. Tais aspectos corroboram com aqueles observados por Baptista (2008); Cavalli (2010); Habacuque (2010); Vono (2011).

Ainda quanto ao modelo experimental, a fim de se garantir uma amostra tecidual de qualidade, para a eutanásia dos animais utilizados neste estudo, optou-se pelo método químico inalável em câmara de CO₂, uma vez que segundo Andrade, Pinto e Oliveira, (2002) este gás é o mais utilizado por não ser inflamável nem explosivo e, por isso mais seguro, além de baixo custo. Sua ação é rápida e provoca depressão no sistema nervoso central, não causando traumas aparentes ao animal. Para Rivera (2010), este gás não se acumula nos tecidos e, portanto, não deixa resíduos que possam, por outro lado, levar a interpretações errôneas.

6.2 Considerações morfológicas macroscópicas

O baixo peso e o retardo do crescimento são os principais dados informados quando se promove qualquer tipo de subnutrição (STEWART; PREECE; SHEPPARD, 1975; NÓBREGA, 1986; CHANDRA, 1991; SAWAYA, 2006), tal fato é confirmado neste modelo experimental, onde os animais subnutridos (S42 e S60) demonstraram menor peso corporal e também exibiram um comprimento significativamente menor no momento da eutanásia comparativamente aos respectivos controles (N42 e N60).

Embora o peso tenha aumentado nos animais dos grupos renutridos (Rp42 e Rt60), verificou-se que esse aumento não foi suficiente para alcançar aquele dos animais dos grupos N42 e N60; tampouco, o comprimento corporal daqueles, se aproximou dos destes, independentemente do período de mudança da dieta aqui empregado, ou seja, aproximadamente 20 dias de tratamento. Dados similares foram demonstrados por Boldrini (2003); Miranda (2006); Oliveira (2006), Baptista (2008); Cavalli (2010); Habacuque (2010); Gonçalves (2011); Luiz (2011); Vono (2011) e, em humanos, na revisão de Monte (2000) e Sawaya (2006). Esta última, ao analisar a recuperação nutricional de 110 crianças subnutridas, observou que o comprimento é restabelecido mais rapidamente que o ganho de peso, e que a densidade mineral óssea recupera-se mais lentamente, todos alcançando os valores de normalidade, através de cuidados necessários.

Ancona Lopez (1973) e Kfoury et al. (1977) relatam que os efeitos da subnutrição tornam-se mais intensos e permanentes quanto mais precocemente ocorrer a injúria, e mais tardiamente for iniciado o processo de recuperação nutricional. Entretanto, no estudo de Ahmad e Rahman (1975), mesmo após uma reabilitação nutricional iniciada imediatamente após o nascimento, os filhotes submentidos à subnutrição pré-natal não recuperaram seu peso corporal, sendo que este fato pode estar relacionado à quantidade de filhotes amamentados pela mesma matriz. Assim, nas fêmeas subnutridas que possuíam uma ninhada maior, a qualidade e a quantidade de leite disponível foram reduzidas resultando, portanto, em filhotes com baixo peso corporal. Por outro lado, autores atribuem este fato a possíveis alterações no tamanho das glândulas mamárias (PINE; JESSOP, 1994) ou mesmo na inatividade dessas glândulas, oriunda de uma dieta com baixo teor de proteína, como mostrado por Platt e Stewart (1968) em cadelas.

Relativamente ao comprimento naso-anal, este parâmetro foi semelhante àquele observado para o peso e o comprimento dos animais aqui analisados, independentemente do

período, se 42 ou 60 dias. Assim, os animais S42 e S60 apresentaram retardo desenvolvimento do comprimento naso-anal, quando comparado aos animais do grupo controle. Da mesma forma, os animais dos grupos tratados (Rp42 e Rt60), apresentaram parcialmente uma melhora do comprimento naso-anal, porém esta melhora não foi suficiente para alcançar as médias dos animais nutridos (N42 e N60). Estas observações acerca do baixo peso, do retardo no desenvolvimento corporal e do comprimento naso-anal podem estar atribuídas a alterações da proliferação celular de precursores da medula óssea, que vão agir em resposta a estímulos de crescimento, gerando um prejuízo no desenvolvimento, justamente nos períodos críticos (pré e pós-natal), onde o animal está mais vulnerável ao aporte protéico (BORSATTO, 1999).

No modelo de subnutrição aqui empregado, é provável que a deficiência protéica tenha provocado alterações na quantidade e na qualidade do leite materno, principal fonte alimentar do nascimento até o desmame. Esta alteração poderia justificar baixo peso dos filhotes ao desmame. Este fato também foi confirmado através das evidências experimentais em subnutrição materna, demonstrando redução na concentração de nutrientes essenciais do leite (MARÍN et al., 1995), bem como, nos baixos valores de energia e proteínas (PEREIRA; BEGUM, 1968). Essa hipótese também é confirmada por Hsueh, Agustin e Chow (1967), os quais mostraram que tanto a qualidade quanto a quantidade de proteína na dieta dos ratos durante a gestação e lactação têm influência profunda sobre o crescimento subsequente dos filhotes.

Os resultados de Ahmad e Rahman (1975) corroboram com os resultados aqui encontrados, onde os pesos corporais dos ratos nascidos de fêmeas submetidas a uma subnutrição protéica foram significativamente mais baixos do que aqueles observados para os respectivos controles. Todavia, tais resultados não se confirmaram ao analisar o estudo de Clos et al. (1977), que não observaram diferenças significantes no peso corporal ao nascimento de ratos oriundos de mães subnutridas.

O baixo peso corporal em várias espécies de mamíferos (como humanos, ratos, camundongos, cobaias, coelhos, cães, porcos, macacos) foi evidenciado por vários autores, os quais atribuíam este fato às fêmeas gestantes subnutridas (NÓBREGA, 1986). Stewart, Preece e Sheppard (1975) investigaram 12 gerações consecutivas de ratos com subnutrição protéica e chegaram à conclusão que, o peso corporal ao nascimento era reduzido na 1^o geração e a proporção de filhotes nascidos com baixo peso foi, progressivamente, aumentando de uma geração para outra. Desta forma, o fato do déficit no peso dos animais subnutridos ter se acentuado progressivamente desde o nascimento até o fim dos períodos experimentais (42 e

60 dias), pode ser explicado pela grave carência nutricional promovida pela dieta empregada neste estudo, ou seja, com apenas 5% de caseína.

Em seu estudo com humanos, DIAZ DEL CASTILLO (1975) observou que gestantes submetidas a dietas hipoprotéicas, geravam crianças com baixo peso ao nascimento; além disso, eles notaram que nestas gestantes havia maior frequência de abortos, natimortos e mortes neonatais. Assim, é possível compartilhar com a ideia de que dietas com baixos teores protéicos, como aqui utilizada, têm sido responsáveis pela maior taxa de natimortos e de morte pós-natal observadas para os animais oriundos das fêmeas submetidas a tal dieta. Desta mesma forma, o ato de canibalismo praticado tanto entre as mães com os filhotes, como entre os filhotes, que foi observado somente nos animais subnutridos, pode estar associado ao estresse provocado pela carência protéica, juntamente a outras condições adversas.

De acordo com Andrade, Pinto e Oliveira (2002) e Braga (2010), o estresse ocorre quando condições adversas como: alimentação, mudança de trocador, manejo, isolamento, métodos experimentais, e barulho excessivo produzem respostas fisiológicas no indivíduo. Entretanto, todos esses fatores foram alvos de cuidado neste estudo, minimizando-os sempre que possível, mesmo sabendo-se que o estresse nesses animais de laboratório é inevitável.

Quanto à alimentação, o rato é muito sensível às mudanças na cor, textura, odor e aparência dos alimentos (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; BRAGA, 2010). Então, nos períodos iniciais do processo de acasalamento, as fêmeas passaram de uma alimentação balanceada à base de *pellets*, para uma alimentação hipoprotéica em pó. Certamente, a manutenção dessas fêmeas sob uma nova dieta, alterada tanto física quanto quimicamente, juntamente a outros fatores adversos, gerou um estresse cumulativo que levou ao canibalismo.

Para Ahmad e Rahman (1975) a extensão em que a nutrição materna influencia o desenvolvimento do feto ainda não é totalmente certa. A fim de esclarecer este fato, os pesquisadores vêm se preocupando em estudar diferentes órgãos, bem como a relação destes com a subnutrição pré e pós-natal.

De acordo com Shrader e Zeman (1969), a subnutrição pré-natal estaria diretamente relacionada ao atraso no desenvolvimento dos pelos. Estes autores observaram que comparativamente aos ratos controle, os animais subnutridos apresentavam, além do atraso no desenvolvimento, uma densidade numérica e tamanhos menores dos pelos. Oliveira (2006) observou alteração na estrutura muscular, como fibras de menor diâmetro associada a contornos irregulares e Miranda (2006), avaliando ossos longos de ratos subnutridos, observou ossos menores em comprimento e espessura, sinais típicos de imaturidade em relação aos respectivos controles nutridos.

Vale aqui salientar que tais observações morfológicas podem ser correlacionadas neste estudo. De fato, os animais subnutridos apresentaram retardo no aparecimento da pelagem, bem como pelos curtos, menos vistosos e de distribuição escassa, exibindo, inclusive, áreas com alopecia. Especificamente com relação ao retardo do desenvolvimento da pelagem, Shrader e Zeman (1969) estudaram histologicamente a reatividade enzimática nas camadas da epiderme dos animais subnutridos e concluíram que a mesma é normal quanto à sua distribuição, estando, porém, bastante reduzidas. Da mesma forma, as células epiteliais dos brotos rudimentares do pelo, assim como os componentes do tecido conjuntivo das papilas em formação, apresentam atividade enzimática reduzida.

Neste estudo, também observou-se, durante o aleitamento, um atraso na locomoção. No momento da formação, uma vez que a quantidade de proteína para o processo de catabolismo apresentar-se reduzida gerará, conseqüentemente, deficiência na disponibilidade de aminoácidos. Assim, novas proteínas por ação do anabolismo não serão sintetizadas, ou seja, não haverá formação de proteínas importantes para o adequado desenvolvimento e maturidade dos ossos e músculos. Contudo, o aumento da disponibilidade desses aminoácidos promovido pelo processo de renutrição, recuperou parcialmente, o aspecto da pelagem. Tal baixa na disponibilidade de macro e micronutrientes, também pode explicar o atraso em processos fisiológicos como o deslocamento das orelhas e a aberturas dos olhos nos animais subnutridos, os quais foram observados, em média, um dia mais tarde que para os respectivos controles.

Relativamente à renutrição, Dickerson, Hughes e McNulty (1972) avaliaram a recuperação de ratos subnutridos durante a gestação e o aleitamento, e relataram que alguns ossos não recuperam seu tamanho. Segundo Mellander e Olsson (1956); Lönnerdal (2003) fosfopeptídeos de caseína influenciam a absorção intestinal de cálcio e que estes podem ter um papel regulador no processo de mineralização de tecidos calcificados. No presente estudo, os animais dos grupos renutridos, independentemente se precoce (Rp42) ou tardia (Rt60), ganharam peso, muito embora não alcançasse aqueles dos animais controle (N42 e N60), supostamente devido ao pouco tempo de renutrição, que foi aproximadamente de 20 dias. Para Sawaya (2006), que avaliou a recuperação nutricional de crianças subnutridas, observou que a densidade mineral óssea recupera-se lentamente, porém, através de cuidados necessários os valores alcançam a normalidade. Desta forma podemos inferir aqui, que talvez não houvesse tempo hábil para a completa recuperação de certos parâmetros aqui avaliados.

As avaliações relativas ao peso corporal aplicam-se também ao encéfalo - órgão alvo desta pesquisa. Nóbrega (1986) relatou que as consequências da subnutrição sobre o cérebro

de um animal adulto são mínimas, porém, consideráveis no animal em desenvolvimento, dado a redução no peso desse órgão devido às alterações encontradas nos diferentes componentes cerebrais. Neste estudo, o retardo no ganho de peso encefálico foi em média, 16,5 e 17,7% nos animais dos grupos S42 e S60 respectivamente em comparação aos grupos N42 e N60. Contudo, ao se analisar os grupos renutridos, estes obtiveram recuperação durante os períodos de tratamento. Esses dados sugerem que o período de tratamento, em média 20 dias independentemente se precoce ou tardio, foi suficiente para promover alterações reversíveis importantes relativas ao peso encefálico nos animais dos grupos Rp42 e Rt60.

A redução do peso encefálico, observada nos animais dos grupos submetidos à restrição protéica de 5% de caseína (S42 e S60), é similar àquela encontrada por Monteiro (2002) em ratos subnutridos, desde a gestação até os 42 dias de vida, e em seguida recuperados. Para Ahmad e Rahman, (1975), os baixos pesos encefálicos sugerem que o processo de crescimento do cérebro foi retardado durante a gestação, e os efeitos adversos foram retidos devido à nutrição inadequada imediatamente após o nascimento. Todavia, Díaz-Cintra et al. (1990) e Fernández et al. (1993) não observaram reduções no peso encefálico de ratos subnutridos. A discrepância encontrada por estes autores em relação a este estudo, poderia ser explicada pela diferença na quantidade e na qualidade da proteína empregada na dieta. Ambos utilizaram dietas com baixos teores de proteína de alto valor biológico, enquanto que, aqui utilizou teores qualitativamente adequados de proteína, porém quantitativamente deficiente aos requerimentos do rato.

Ao se analisar qualitativa e macroscopicamente os encéfalos assim que foram removidos da caixa craniana, não foram detectadas diferenças significativas entre os animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) no que se refere à coloração, consistência e textura dos mesmos. Contudo, os encéfalos dos animais S (42 e 60) exibiram sulcos menos pronunciados quando comparados, respectivamente, aos animais N (42 e 60), ou seja, estes primeiros apresentaram-se mais lisos, sugerindo sinais de imaturidade. Quanto ao tamanho, aqui notou-se apenas uma ligeira discrepância, sugerindo que o organismo possui capacidade de estabelecer prioridades, preservando órgãos vitais como o encéfalo. Fato digno de nota, quanto ao deslocamento deste órgão de sua cavidade, foi a delgada espessura da pele da calvária, a fragilidade muscular e óssea e, em seguida, a tênue dura-máter. Shrader e Zeman (1969) investigaram a pele de ratos subnutridos e verificaram espessura reduzida da epiderme e células menos alongadas na camada germinativa, Oliveira (2006) observou estrutura muscular alterada, enquanto Miranda (2006) relatou imaturidade quanto ao desenvolvimento de ossos longos.

A redução do peso e do tamanho encefálico, em ratos, parece estar principalmente associada à subnutrição pós-natal (DOBBING; SANDS, 1979), quando a extensiva diferenciação celular e a multiplicação glial estão mais sensíveis (MORGANE et al, 1993). Diante de todas as evidências, pode-se afirmar que o modelo experimental aqui utilizado, alterou, de fato, parâmetros anatômicos corporais e encefálicos. Contudo os animais dos grupos renutridos (Rp42 e Rt60) tiveram restabelecimento do peso encefálico, independentemente do fator idade. Para Ahmad e Rahman (1975), estudos em ratos mostraram que uma subnutrição severa inibiu o crescimento encefálico e que a reversibilidade destes efeitos depende do tipo de subnutrição imposta, da duração da privação nutricional e do período durante o qual ocorre a subnutrição. Segundo Morgan e Winick (1985), uma pequena diminuição nos níveis ótimos de um simples nutriente durante períodos críticos de desenvolvimento e crescimento cerebral, como no caso da proteína caseína, considerada uma proteína estrutural, pode significar um atraso neste processo, que nem mesmo uma reabilitação nutricional poderia reverter.

Em resposta a subnutrição, o encéfalo parece ser menos atingido do que qualquer outro órgão. Tal fato, classicamente referido por Winick e Noble (1966), demonstra que mecanismos de proteção são atraídos com objetivo único de poupar o encéfalo da agressão nutricional em relação aos demais órgãos. Essa evidência foi confirmada neste estudo, uma vez que, a relação peso encefálico/peso corporal nos animais dos grupos S42 e S60, foi, aproximadamente, 5 vezes maior que aquelas observadas para os animais dos respectivos grupos N42 e N60.

Foi proposta por Hales e Barker (1992), a teoria do “fenótipo econômico”, a qual esclarece que o desenvolvimento fetal é sensível ao ambiente nutricional. Quando este é escasso, uma resposta adaptativa é instigada para beneficiar o crescimento de órgãos como o encéfalo, em detrimento de outros. Esta programação fetal teria como objetivo aumentar as chances de sobrevivência do feto e resultaria em um alterado metabolismo pós-natal, o qual, também aumentaria as chances de sobrevivência sob condições de nutrição precária e intermitente.

Ao considerar o atraso no desenvolvimento antropométrico dos animais dos grupos subnutridos e renutridos, de alguma forma a subnutrição repercutiu de forma menos severa nas dimensões encefálicas, assim como observado para os pesos encefálicos.

Segundo Winick e Rosso (1969b), a circunferência craniana é uma medida indireta, comumente utilizada para a avaliação do crescimento encefálico. Desde que se observou esta

correlação, esta medida tornou-se importante sendo estabelecidas fórmulas aproximativas entre a circunferência craniana e o peso encefálico.

Estudos com crianças subnutridas mostraram redução significativa da circunferência craniana, sendo estes valores mais acentuados nas crianças marasmáticas (WINICK; ROSSO, 1969a), que nas crianças com *kwashiorkor* (GRAHAM; MORALES, 1963). Chase e Martin (1970) investigaram crianças subnutridas no primeiro ano de vida, e concluíram que estas apresentavam *déficits* na altura, no peso e na circunferência encefálica. Estes autores associaram estes *déficits* com o momento e a duração da subnutrição. Tais achados estão em total acordo com os resultados aqui encontrados, onde observou-se que a partir de uma subnutrição pré e pós-natal, a circunferência craniana dos animais S42 e S60, bem como as outras dimensões encefálicas avaliadas, como os eixos rostro-caudal, látero-lateral e dorso-ventral, apresentaram redução significativa de seus valores, comparativamente aos controles (N42 e N60). Esta redução está de acordo com os estudos de Nóbrega (1986), o qual relata que as dimensões encefálicas podem encontrar-se diminuídas, dada a redução no peso e no tamanho deste órgão, referente possivelmente a alterações reducionais nos diferentes componentes cerebrais.

De um modo geral, de 42 para 60 dias, tempo máximo do período experimental, observou-se um discreto aumento dessas dimensões em todos os animais, inclusive naqueles tratados (Rp42 e Rt60) sugerindo uma possível tentativa de crescimento e amadurecimento deste órgão frente à renutrição. Ângulo-Colmenares (1979), após renutrição realizada em ratos submetidos a uma dieta hipoprotéica, averiguou que aquelas dimensões encefálicas as quais apresentaram-se diminuídas, tiveram restabelecimento dos valores compatíveis com aquelas consideradas normais. Entretanto, quanto às dimensões encefálicas avaliadas neste estudo, os animais dos grupos renutridos não recuperaram valores para o eixo látero-lateral. Como o encéfalo não é um órgão de crescimento homogêneo, suas diferentes áreas mostram diversos graus maturação. Este fato pode estar associado ao maior crescimento de alguma estrutura em detrimento de outra. Vale aqui salientar que tais observações morfológicas não foram referidas na literatura à qual se teve acesso.

Segundo Sawaya (2006), quando o indivíduo recebe, no início da vida, uma alimentação insuficiente, há um atraso no desenvolvimento do organismo, causando uma "programação" para economizar energia. Esta economia viria através da diminuição da taxa de metabolismo de repouso e consequentemente do acúmulo de gordura.

Segundo Lee (1929)¹⁵, apud Bernardis e Peterson (1968), o índice de Lee pode ser utilizado como um índice relativamente preciso e, rapidamente obtido sobre os graus de sobrepeso e/ou obesidade para ratos, e este depende do comprimento do animal em função do seu peso corporal. Considerando os achados deste estudo, observou-se que, houve diferença significativa para este parâmetro relativamente aos animais subnutridos (S42 e S60). Interessantemente, estes animais apresentaram um índice de Lee crescente, enquanto os respectivos controles apresentaram valores decrescentes, corroborando com os estudos de Sawaya (2006), a qual verificou um aumento de adiposidade em crianças subnutridas. Tal fato sugere que, indivíduos subnutridos, podem tornar-se obesos na fase adulta.

Quanto à circunferência abdominal, esta foi utilizada para avaliação de um possível quadro de edema abdominal, “ascite”, característica do *kwashiorkor*. Indivíduos que sofrem de carência protéica possuem sintomas como abdome distendido, sendo ocasionado pela redução das proteínas plasmáticas, diminuindo, assim, a pressão coloidosmótica e, conseqüentemente, o fluxo osmótico através das paredes dos capilares (NÓBREGA, 1986). Apesar desta característica ser claramente observada em humanos, fato que diferencia crianças com *Kwashiorkor* daquelas marasmáticas, neste estudo não foi observado aumento deste parâmetro para os animais dos grupos subnutridos (S42 e S60). Porém, tais observações relativas à circunferência abdominal e o índice de Lee associados à subnutrição não foram referidas na literatura à qual se teve acesso.

6.3 Considerações metabólicas

Embora tenhamos realizado as avaliações metabólicas nos períodos I- entre o 22º e o 26º dias; II- entre o 38º e 46º dias; III- entre o 56º e 60º dias, utilizou-se aqui, para o aspecto quantitativo apenas os períodos II e III para os animais de 60 dias. Contudo, as considerações qualitativas foram realizadas nos três períodos e estão descritas a seguir juntamente aquelas quantitativas.

Segundo a Instrulab (2012), as gaiolas metabólicas foram estudadas ao longo dos anos especialmente para garantir características exclusivas como: separar as fezes da urina em frascos fora da câmara, resultando em coletas independentes e amostras sem nenhum risco de

¹⁵ LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. **The American Journal of Physiology**, v. 89, p. 24-33, 1928

contaminação. A gaiola foi composta por diversas, a fim de facilitar a operação, sem perturbar os animais. A câmara de alimentação é bi-partida e encontra-se localizada fora da gaiola, sendo esta localização, juntamente ao tamanho do alimentador impedem que o roedor aninhe-se ou durma dentro dela¹⁶.

Interessantemente, durante as observações realizadas nesta gaiola, nos períodos I, II e III, esclarecidos no tópico materiais e métodos, notou-se que os animais dos grupos subnutridos, encontravam-se recolhidos no recipiente de ração, local possivelmente mais confortável, visto o tamanho reduzido desses animais, comparativamente aos dos demais grupos experimentais. Aliás, quanto a esse aspecto, vale aqui salientar que a diferença quanto ao tamanho corporal reduzido dos animais subnutridos, é aproximadamente a metade daquele observado para aos animais nutridos e renutridos.

Estas gaiolas foram fabricadas de acordo com as normativas americanas para o bem estar de animais de laboratório, sendo sua câmara superior de policarbonato, perfeita para visibilidade do interior sem perturbar o animal (INSTRULAB, 2012). De acordo com Andrade, Pinto e Oliveira (2002), os ratos são animais sociáveis e, por isso, o isolamento poderia levá-los a desenvolverem comportamentos de má adaptação, como automutilação, timidez, agressividade excessiva, entre outros.

Apesar dos animais utilizados no presente estudo, terem sido privados do relacionamento social com outros animais, estes não apresentaram características como aquelas citadas acima. Contudo, foi observada principalmente nos animais subnutridos, uma inquietação que se prolongou desde o desmame até a fase mais tardia do experimento (60 dias). Porém esta hiperatividade não foi associada ao fato destes animais permanecerem isolados, e sim, à alimentação imposta, uma vez que este comportamento somente foi observado para os animais dos grupos subnutridos (S42 e S60).

Ainda, vale aqui comentar que, o fato das gaiolas estarem posicionadas uma ao lado da outra e, serem fabricadas por um material que permite visibilidade, de alguma forma, este fato contribui para que o animal não se sinta isolado, uma vez que o mesmo consegue perceber o outro, diminuindo assim o estresse, mesmo sem o contato físico. De acordo com Andrade, Pinto e Oliveira (2002), a hiperatividade pode estar associada a uma resposta fisiológica típica de estresse devido às alterações na quantidade e na qualidade da dieta, bem como nas mudanças substanciais de horários e de tratador para reposição alimentar e hídrica.

¹⁶ Vide figura 11 p. 60 e 12, p. 61

O nosso órgão controlador de toda a atividade metabólica, que é o sistema nervoso, se “programa” permanentemente para economizar energia em forma de gordura e reduzir o crescimento, para garantir a sobrevivência em condições adversas (SAWAYA, 2006). Não há dúvida que a subnutrição seja responsável por alterações estruturais, funcionais, endócrinas e metabólicas em todos os níveis do organismo (NÓBREGA, 1986). Esta afirmação corrobora com os estudos de vários autores sobre as avaliações metabólicas a que os animais são submetidos (OLIVEIRA, 2006; BAPTISTA, 2008; HABACUQUE, 2010; CAVALLI, 2011; LUIZ, 2012; VONO, 2012).

Tais observações também foram notadas neste estudo, em todos os parâmetros metabólicos aqui avaliados como (ingestão alimentar e hídrica e, excreção de fezes e urina), onde os animais subnutridos (S60) apresentaram-se com médias inferiores àquelas observadas para os respectivos controles (N60), independentemente do período avaliado (II e III).

Os animais renutridos (Rt60), em todos os parâmetros metabólicos acima citados não restabeleceram suas atividades metabólicas, apresentando dados inferiores aos dos animais controle (N60), durante o período em que foi submetido à dieta normoprotéica. Entretanto, ao se avaliar estes animais, comparando-os aos subnutridos no período II, estes apresentaram-se semelhantes em praticamente todos os parâmetros acima citados, exceto pela ingestão hídrica que mostrou-se elevada nestes animais, possivelmente devido a substituição da dieta hipoprotéica pela normoprotéica.

Ao se avaliar a razão *ingestão alimentar/peso corporal*, verificou-se que os animais subnutridos (S60 e Rt60) ingeriram, proporcionalmente, mais ração, indicando supostamente uma necessidade maior de se alimentar, com o intuito de suprir a carência protéica. Desta forma, segundo Cavalli, 2011, é conveniente considerar as ações da leptina (hormônio da saciedade) e da grelina (hormônio da fome), que estão envolvidas diretamente no mecanismo do apetite. Assim, a leptina é produzida e liberada diretamente proporcional à massa de tecido adiposo no organismo, sinalizando, portanto, ao hipotálamo a quantidade de energia armazenada, bem como a regulação da ingestão alimentar e, por outro lado, do hormônio intestinal grelina, responsável pelo aumento do apetite (SAVINO et al., 2007; WERNETTE; WHITE; ZIZZA, 2011), a qual atua no trato gastrointestinal e, quando estimulada pela fome, determina a liberação de enzimas gástricas e do hormônio do crescimento (GH), estimulando o hipotálamo a intensificar os mecanismos para aquisição de energia (KOJIMA et al., 2001; KRSEK et al., 2003; WERNETTE; WHITE; ZIZZA, 2011). Ainda, o GH deve ser considerado, visto que a restrição protéica, como esta aqui aplicada, causa um aumento nos níveis séricos do mesmo, realizando então a lipólise, garantindo a manutenção do corpo

(PIMSTONE et al., 1968). A partir deste fato, a secreção de leptina diminui no tecido adiposo, diminuindo, portanto, o processo de retroalimentação da ingestão alimentar junto ao hipotálamo, fazendo o animal ingerir alimento em excesso, sem saciá-lo (BAPTISTA, 2008).

Tais hipóteses podem ser aplicadas no presente estudo e corroboram com Desai, Babu e Ross (2007), os quais verificaram que filhotes oriundos de matrizes submetidas à restrição protéica, apesar de receberem uma dieta normal (renutrição) após o desmame, desenvolve uma síndrome metabólica que promove o aumento do apetite, induzindo o animal a desenvolver obesidade na fase adulta. Tal fato está de acordo com os estudos de Sawaya (2006), baseado em avaliações com crianças subnutridas e posteriormente renutridas. Em ratos expostos à subnutrição intrauterina, foram observadas maiores concentrações de leptina, indicadores da síndrome metabólica na idade adulta, devido a alterações no genótipo dos animais (MORRIS et al., 2009).

Embora não se tenha detectado diferença estatisticamente significativa quanto à razão *excreção de fezes/ingestão alimentar*, aparentemente o grupo renutrido (Rt60) mostra uma tendência ao aumento dos valores, sugerindo uma possível relação com a adaptação à nova dieta imposta. Esta hipótese de adaptação alimentar também se aplica aos resultados referentes à razão *ingestão hídrica/peso corporal*, onde os animais Rt60 destacaram-se daqueles subnutridos (S60) por apresentar as maiores médias. Quanto à razão *ingestão hídrica/ingestão alimentar*, foi observado que o grupo S60 consome mais ração proporcionalmente à quantidade de água ingerida, reforçando a ideia da não saciedade alimentar por ação da leptina, como referido por Baptista (2008). Houve uma semelhança entre os valores relativos à razão *excreção de urina/ingestão hídrica* entre grupos (S60 e Rt60), os quais eliminou pouca urina em relação a quantidade de água ingerida comparativamente ao grupo N60. Estes achados estão de acordo com aqueles encontrados por Luiz (2012), a qual associa este fato a uma maior retenção de água nos tecidos, provavelmente pelo baixo nível de proteínas plasmáticas causada pela subnutrição.

Desta forma, acredita-se que estes dados são importantes, uma vez que na literatura que se teve acesso não foram encontrados resultados conclusivos, limitando-se apenas a comentários sobre o sucesso da intervenção nutricional no metabolismo, quer seja de animais ou humanos subnutridos.

6.4 Considerações morfológicas microscópicas

O tecido cerebral é extremamente ativo do ponto de vista metabólico. O cérebro corresponde à aproximadamente 2% do peso corporal em humanos e este, por sua vez, consome uma quantidade de energia desproporcional às suas dimensões. Cerca de 15% do débito cardíaco e 20% do oxigênio corporal destina-se ao metabolismo cerebral, sendo estes valores observados para um homem adulto normal em repouso (McCALL, 2004).

A baixa ingestão protéica, ou seja, dietas nas quais há falta de determinados aminoácidos essenciais, levam a profundas modificações orgânicas e alterações metabólicas variadas (ZAMENHOF et al., 1974). Para Stone (1972), grande quantidade de aminoácidos do encéfalo apresenta relação com o metabolismo da glicose, funcionando como um mecanismo homeostático, protegendo o encéfalo de variações abruptas de glicose. A oferta imediata de qualquer nutriente, bem como da glicose para o cérebro, é dada através da circulação, havendo também reservas, em forma de glicogênio, armazenada nos astrócitos (McCALL, 2004). Diante do exposto, salienta-se a importância da boa manutenção dos níveis nutricionais e metabólicos normais para este tecido, cujas injúrias poderiam levar ao desequilíbrio funcional. Morgane (1993) esclareceu que a maioria dos nutrientes participa de alguma forma, do processo de maturação cerebral. Entretanto, as proteínas pareceram ser o componente mais crítico para o desenvolvimento das estruturas e funções neurais.

De acordo com os resultados deste estudo, o encéfalo parece estar parcialmente protegido das carências nutricionais. Ao se avaliar a composição nutricional das dietas aqui utilizadas, pode-se observar uma maior porcentagem de carboidratos na dieta hipoprotéica¹⁷. Assim, por ocasião do processo de catabolismo, o carboidrato gerará glicose que pode estar associado à preservação do encéfalo ou do tecido nervoso.

O encéfalo não é um órgão de crescimento homogêneo, suas diferentes áreas mostram diversos graus de proliferação celular e os vários tipos de células dividem-se em diferentes períodos de tempo. Nos hemisférios cerebrais, a multiplicação celular se processa mais lentamente, porém se estende por um período maior, aumentando seu conteúdo 2,5 vezes entre o 6º e o 21º dia de vida (FISH; WINICK, 1969).

O crescimento dos tecidos, incluindo o cérebro, é resultado da divisão e do aumento no tamanho das células (WINICK; NOBLE, 1965). Assim as consequências da subnutrição

¹⁷ Vide figura 10, p. 58

protéica sobre o cérebro de um animal adulto são mínimas, porém são fundamentais em um animal em desenvolvimento (DOBBING; HOPEWELL; LYNCH, 1971; DOBBING, 1972; MORGANE et al., 1978, NÓBREGA, 1986)

Quanto ao método de coloração aqui utilizado para as avaliações quantitativas como o de Nissl, este é apropriado, uma vez que permite ótima visualização dos elementos neuronais do córtex cerebral, bem como diferenciar as células características de cada lâmina cortical. Esta justificativa corrobora com os relatos de Williams et al. (1989), os quais afirmam que nos cortes corados pelo simples método de Nissl, é possível apreciar, entre outras células, os corpos das grandes células piramidais, constituintes da lâmina V, ou lâmina piramidal interna e estas possuem neuritos que se estendem através das lâminas corticais. Estes autores ainda colocam que a quantificação utilizando este método, também é fidedigna e, concluem que, cerca de dois terços dos neurônios do córtex cerebral são piramidais e o terço restante é não piramidal.

No que concerne ao aspecto qualitativo da organização geral do córtex cerebral, através das técnicas histológicas utilizada neste estudo, como o H.E e o violeta cresil (método de Nissl), foi possível observar que, de um modo geral, houve uma redução desta estrutura nos animais subnutridos (S42 e S60), quando comparado àqueles submetidos à dieta normoprotéica (N42 e N60). O córtex cerebral dos animais de todos os grupos experimentais (N42 e N60; S42 e S60; Rp42 e Rt60) apresentaram, basicamente, a mesma morfologia, ou seja, a mesma laminação, apresentando sem maiores dificuldades de identificação, as seis lâminas corticais.

Shrader e Zeman (1969) observaram estratificação anormal no córtex cerebral de ratos submetidos à restrição protéica pré-natal. Neste estudo, quanto aos neurônios constituintes desta estrutura, verificaram-se uma uniformização no padrão de distribuição dos mesmos, onde estes apresentaram-se sob formatos e tamanhos característicos de cada lâmina, sendo eles, principalmente, de aspecto granular, piramidal e fusiformes, cada um com predominância em suas lâminas específicas, não sendo observado nenhuma alteração estrutural graves na laminação ou no formato neuronal dos animais experimentais.

Sabe-se que, no córtex cerebral a neurogênese ocorre de forma ordenada e precisa, em época geneticamente programada. A principal lesão que se observa na subnutrição protéico-calórica consiste na redução da proliferação celular, em consequência da modificação na duração do ciclo de gênese celular, tornando-o mais prolongado (MORGANE et al., 1993). Lewis, Patel e Balazs (1979) investigando o hipocampo, através de injeção de timidina

marcada no 2º dia de gestação em ratas submetidas à subnutrição protéico-calórica, verificaram que a programação da neurogênese não estava afetada.

Estudos radioautográficos do cérebro de feto de camundongos, cujas mães haviam sido submetidas à subnutrição protéico-calórica, mostraram redução, de cerca de 15%, na atividade proliferativa das células matrizes desses animais. Este atraso é responsável pela redução da produção neuronal, com a consequente diminuição da espessura cortical (SHIMADA et al., 1977). Estudos ultraestruturais realizados no córtex cerebral de fetos de matrizes oriundas de subnutrição protéica, concluíram que as células germinativas e os neurônios jovens em migração, são muito vulneráveis à subnutrição, alguns dos quais degeneram, sendo que a necrose neuronal poderia ser uma dos fatores responsáveis pela redução da espessura cortical em fetos subnutridos (YAMANO et al., 1980).

Em ratos recém-nascidos, cujas mães sofreram restrição calórica do 10º até o 20º dia de gestação, o córtex apresentou espessura reduzida (CLARK et al., 1973). O mesmo é observado em camundongos, cujas mães sofreram subnutrição do 8º ao 16º dia da gestação (YAMANO et al., 1980). Também em ratos com subnutrição pré-natal, West e Kemper (1976) verificaram redução da espessura cortical e de 16% da camada molecular, não diminuindo significativamente a camada granular.

No presente estudo foi verificado que a espessura cortical, além de estar reduzida nos animais dos grupos S42 e S60 e Rp42 e Rt60, apresentava variação da mesma quando considerada as várias áreas corticais. Isto está de acordo com o mencionado por Williams et al. (1989), os quais relataram que a variação de espessura cortical nas diferentes áreas pode muito bem corresponder as variações microestruturais no córtex cerebral, considerando que o mesmo não possui um desenvolvimento homogêneo.

Ângulo-Colmenares (1979) também observou espessura cortical reduzida em sua investigação, a partir da avaliação em ratos submetidos à uma dieta hipoprotéica, porém após renutrição foram observados valores compatíveis com aqueles considerados normais. Araújo (1998) infere que, a redução da espessura cortical ocorrida em animais jovens subnutridos tenha desaparecido após recuperação nutricional. Independentemente se o processo de renutrição foi precoce ou tardio, no presente estudo, não foi verificado recuperação da espessura cortical comparativamente aos animais dos grupos N42 e N60. A partir deste resultado e, avaliando-se o tempo de tratamento (renutrição) a que os animais foram submetidos, pode-se supor que, o período de aproximadamente 20 dias, tenha sido insuficiente para permitir restabelecimento deste parâmetro. West e Kemper (1976) avaliaram o comprimento dos dendritos das células granulares e observaram uma diminuição de 19%

nos mesmos e associaram a redução da espessura cortical à redução do comprimento dos dendritos, principalmente daqueles apicais em ratos subnutridos pré e pós-natal.

A estrutura microscópica do córtex cerebral, bem como da substância cinzenta em outras partes, é uma mistura intrincada de fibras e células nervosas, neuroglia e vasos sanguíneos (WILLIAMS et al., 1995).

Estudos realizados por Sugita (1918) e posteriormente confirmados por Leuba e Rabinowicz (1979), revelaram que o número de neurônios corticais parece não sofrer com as agressões nutricionais. Leuba e Rabinowicz (1979) e Bedi e Warren (1983), relataram que diante de uma agressão nutricional, os neurônios corticais, de alguma forma são poupados, o que poderia sugerir um mecanismo de resistência celular. Entretanto, este mecanismo tem sido considerado por estes autores como patológico, o qual promove um agrupamento anormal de células, que vem sendo denominado na literatura de "empacotamento celular" (do inglês, "*cell packing*"). Esta hipótese do "empacotamento celular" é reforçada por Morgane et al. (1978) e Levitsk e Strupp (1995), através da notória redução da espessura cortical, bem como das dimensões neuronais e da mielina no espaço intercelular.

A homogeneidade numérica, juntamente à densidade de volume neuronal do córtex cerebral observadas no presente estudo, está de acordo com as investigações de Winick e Noble (1966); Siassi e Siassi (1973) e Nóbrega (1986), os quais relataram que no córtex cerebral, os neurônios não se dividem após o nascimento e, por isso, não são afetados pela subnutrição pré e pós-natal, como esta aqui empregada. Contudo estes autores identificaram maior redução de células neurogliais.

Neste estudo, como não foram observadas alterações no número e na densidade de células neuronais que possam ser correlacionados com a subnutrição, observou-se no córtex cerebral, uma redução, ou um indicativo de redução, em ambos os parâmetros, quando se observa o fator idade. Assim, especificamente nas lâminas corticais, de 42 para 60, nota-se uma diminuição do número neuronal, apenas nas lâminas granular e piramidal externa. Quanto à densidade neuronal, esta redução foi observada apenas para a lâmina multiforme. Estas características podem estar relacionadas ao envelhecimento natural do indivíduo.

Brody (1995) concluiu que 50% dos neurônios são perdidos em decorrência do processo de envelhecimento e, desde então, a diminuição do córtex cerebral tem sido, principalmente explicada por esta perda neuronal relacionado à idade. Porém, os primeiros estudos indicam que a redução cortical, juntamente à perda neuronal durante o envelhecimento poderia ser atribuída a não distinção de cérebros de idosos considerados normais, daqueles com doença de Alzheimer, os quais ainda não haviam sido diagnosticados

(TERRY; DETERESA; HANSEN, 1987). Outros autores acreditam que a acentuada perda de neurônios corticais poderia dever-se aos processos de fixação para as análises histológicas e não ao envelhecimento. Desta forma, após correção deste “encolhimento”, estes concluíram que a idade não acarretaria em perda significativa de neurônios no córtex cerebral humano (HAUG; EGGERS, 1991).

Muito embora, uma das características mais relevantes do encéfalo relacionadas ao processo de envelhecimento, seja a redução do volume do mesmo. Recentemente, autores relatam que não ocorre perda extensiva de neurônios em decorrência da idade em humanos, desta forma, esses relatos enfraqueceram a premissa da perda neuronal no envelhecimento. Ladd et al. (2012) avaliando roedores através de métodos estereológicos, sugere estabilidade numérica de neurônios, ou o possível aumento destes, com o avançar da idade, sendo este fato associado a um possível mecanismo de “empacotamento celular”, mecanismo este, relatado anteriormente por Morgane et al. (1978); Leuba e Rabinowicz (1979); Bedi e Warren (1983) e Levitsk e Strupp (1995), de neurogênese ou maturação tardia e da diferenciação incompleta. Desta forma, a literatura mostra que a definição do número, bem como da densidade neuronal durante o envelhecimento ainda é um paradoxo em neurociência.

Para Williams et al. (1995), a densidade de agrupamento neuronal, nas diferentes áreas do córtex e de suas lâminas, mostra muita variação, sendo mais densa, como observado para o área estriada e, talvez menos densa no giro pré-central. Shrader e Zeman (1969), avaliaram o córtex cerebral de ratas submetidas a uma subnutrição protéica pré-natal e, verificaram que este, mostra estratificação anormal e redução no número dos grandes neurônios multipolares. Aparentemente, ocorre redução do número de células da camada subcortical cerebral, bem como, das células granulares e das células de purkinje do cerebelo.

Este fato pode justificar a diminuição da densidade neuronal da lâmina multiforme e o número de neurônios das lâminas granular e piramidal externa. De acordo com Machado (1993), tanto as células da lâmina multiforme, como aquelas da lâmina piramidal externa são células efetadoras, e estas possuem axônios descendentes que penetram nas camadas subcorticais. Uma vez que, a subnutrição causa uma redução do número de células da camada subcortical cerebral, funcionalmente as células das lâminas corticais, as quais fazem conexões subcorticais, podem entrar em apoptose, devido à diminuição das sinapses das mesmas.

Da mesma forma, as células da lâmina granular podem apresentar-se com redução numérica, uma vez que, estas células são consideradas como os principais interneurônios corticais, ou seja, são as principais células receptoras do córtex cerebral, as quais recebem a maioria das fibras que chegam ao córtex, além de fazer conexões com células das lâminas

vizinhas (MACHADO, 1993). Portanto, alterações causadas nas camadas subcorticais, bem como, alterações nas lâminas vizinhas, podem acelerar o processo de morte natural destas células. Ainda vale aqui salientar, que a hipótese de redução celular devido ao processamento histológico para as avaliações e quantificações não poderia ser descartado.

Para Williams et al. (1989), as variações em uma única área, em indivíduos diferentes de uma mesma espécie, associado aos efeitos do desenvolvimento, e preguçamento cortical, podem contribuir para as aparências estruturais variáveis no córtex cerebral, variações estas que podem não ser uniformes, visto que algumas áreas recebem ou projetam grandes conexões corticais e/ou subcorticais.

Todavia, é oportuno comentar que não foram encontrados, pelo menos na literatura consultada, dados acerca do perfil das lâminas corticais individualizadas frente à subnutrição, que pudessem ser confrontados com os resultados aqui descritos.

Quanto à renutrição, Morgan e Winick (1985) sugerem que até mesmo uma pequena diminuição de um simples nutriente, durante os períodos críticos de desenvolvimento e crescimento cerebral, como no caso da restrição da proteína de caseína aqui empregada, poderia significar um atraso no processo mitótico e no crescimento celular, que nem mesmo uma reabilitação nutricional conseguiria reverter. Já Leuba e Rabinowicz (1979), avaliando camundongos subnutridos na fase pré e pós-natal, ou somente durante a fase pós-natal e, posteriormente recuperados nutricionalmente, evidenciaram número neuronal no córtex cerebral semelhante aos controles, porém maior densidade neuronal. Esta hipótese não está de acordo com os resultados aqui obtidos, uma vez que a subnutrição parece não ter afetado a mitose neuronal e, conseqüentemente, para o número e para a densidade neuronal no córtex cerebral, o tratamento nutricional não teve qualquer influência.

No que se refere à área neuronal, o córtex cerebral parece ser uma das estruturas cerebrais, particularmente afetadas por esse tipo de insulto nutricional, visto que neste estudo observou-se uma significativa redução da mesma. Stewart, Merat e Dickerson (1974) investigando ratos subnutridos pré e pós-natal e observaram redução no tamanho dos neurônios e, as bainhas de mielina eram mais delgadas, comparativamente aos animais controle, correlacionando estes achados com a redução da espessura cortical. Para Yamano et al. (1980), a maturação dos neurônios jovens é afetada pela subnutrição pré-natal.

Segundo Brown e Pollitt (1996), até aproximadamente dois anos de vida em humanos, a subnutrição pode provocar graves sequelas, uma vez que coincide com a fase em que há um crescimento acelerado do corpo e o encéfalo cresce, em torno de 80% do seu tamanho adulto, necessitando, portanto, de uma maior necessidade de nutrientes. Assim, uma restrição proteica

nesta fase, poderia prejudicar o desenvolvimento mental e, conseqüentemente, intelectual através de um dano estrutural irreversível como, por exemplo, a alteração na área neuronal, o que de fato foi observada neste estudo.

Esta significativa diminuição da área neuronal, pode estar relacionada à diminuição da síntese de proteínas pelas células corticais (anabolismo), provocadas pela subnutrição protéica pré e pós-natal. De acordo com Lajtha et al., 1979, durante o período de rápido crescimento encefálico, a taxa de biossíntese de proteínas está aumentada em cinco vezes, quando comparada aos animais adultos. Assim, pode-se concordar com esta hipótese, sendo que, esta biossíntese protéica poderia estar alterada pela carência proteica provocada pela subnutrição experimental aqui investigada, dada a reduzida disponibilidade de aminoácidos para o processo de catabolismo.

Como consequência da subnutrição, em um período crítico, Morgane et al. (2002) relataram que pode ocorrer uma limitada plasticidade no encéfalo, uma vez que, este fato permite que a reabilitação nutricional associada a outros fatores ambientais, exerça algum efeito de melhora após a injúria nutricional.

Araújo (1998) infere que a redução das dimensões neuronais, ocorridas no em ratos jovens, tenha desaparecido após recuperação nutricional. O aumento na área do corpo celular foi um indicativo de que, a recuperação nutricional reverteu o efeito promovido pela subnutrição crônica, imposta no início da vida. Esta hipótese aplica-se aos resultados aqui encontrados acerca da subnutrição.

De todos os parâmetros aqui avaliados, o único que sugere que a renutrição precoce tende a ser mais eficiente do que aquela realizada tardiamente, foi a avaliação quanto à área neuronal, onde observou-se diferença estatística quando se compara os dois períodos de tratamento. Desta forma, os animais renutridos precocemente (Rp42), embora não tivesse recuperado os valores observados para os animais nutridos (N42 e N60), estes apresentaram valores superiores, relativamente aos animais renutridos tardiamente (Rt60).

Esta ideia pode ser compartilhada com Nóbrega (1986), o qual relata que as lesões produzidas pela subnutrição em períodos mais curtos, parecem ser reversíveis se há retorno de uma dieta normal, contudo, podem permanecer como uma sequela definitiva quando esta agressão nutricional é prolongada. Morgane et al. (2002), acreditam que interferências temporais na progressão de processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos no desenvolvimento do SNC, podem desencadear *déficits* funcionais permanentes.

Em linhas gerais, as áreas médias do perfil celular dos neurônios corticais, nos animais dos grupos S42 e S60, permitem inferir que, a subnutrição diminui esse parâmetro e, que o

tempo de tratamento (aproximadamente 20 dias), não foi capaz de restabelecer a área desses neurônios, considerando os períodos aqui determinados (precoce – de 21 até os 42 dias e tardio - a partir dos 42 até os 60 dias). Muito embora, considerando o aspecto da renutrição, não observou-se diferenças significantes entre Rp42 e Rt60, portanto, as proporções observadas para este parâmetro, relativamente aos animais renutridos precocemente, sugerem uma tendência à recuperação, o que leva a crer que, a renutrição precoce poderia reverter os danos causados pela subnutrição.

Os aminoácidos livres apresentam, além das funções relacionadas com a síntese protéica, a produção de energia e de compostos aminados. Acumulam funções importantes como elementos precursores de aminas, com atuação na atividade elétrica cerebral, ou atuando diretamente como neurotransmissores, com atividade inibidora ou excitadora. Apesar das alterações morfológicas presentes no encéfalo de fetos subnutridos, a atividade enzimática neuronal parece normal, porém as propriedades tintoriais são atingidas pela subnutrição (NÓBREGA, 1986).

De acordo com Snyder (1992), a técnica histoquímica para a NADPH-d marca o corpo e os processos dendríticos dos neurônios NADPH-d positivos, os quais correspondem a uma pequena população neuronal de aproximadamente 1% - 2% de todos os neurônios corticais. Conforme proposto neste estudo, estes neurônios, considerados como nitrérgicos, foram investigados. Nestes, foram observadas uma possível alteração relativamente à sua reatividade, onde a maioria geralmente apresentava-se intensa, enquanto outros apresentava-se menos reativos.

Os resultados deste estudo, bem como de outros, os quais utilizaram protocolos semelhantes ao aqui aplicado para marcação de neurônios nitrérgicos, devem ser analisados com cautela, uma vez que, a intensidade da reação, pode estar diretamente associada ao tempo em que se expõe o tecido ao reagente. Assim, autores como Kuo et al. (1997); Montedonico et al. (2006) e Cserni et al. (2009), revelando preocupação com este fato, ao utilizarem a técnica histoquímica da NADPH-d, a fim de avaliarem os aspectos morfoquantitativos do plexo mioentérico, por meio de diferentes tempos de incubação, concluíram que a determinação da intensidade de reação e da população neuronal é, diretamente, proporcional ao tempo de exposição ao reagente.

Ainda foram observadas, no presente estudo, alterações estruturais relativamente à sua área, onde esta foi estatisticamente reduzida nos animais subnutridos (S42 e S60). Portanto, é possível que a insuficiência de proteínas e, conseqüentemente, de aminoácidos essenciais na dieta, tenha causado alterações nas estruturas morfológica e química dos neurônios NADPH-d

positivos. Corroborando com os resultados aqui encontrados, Nóbrega (1986) relatou que, a área do corpo celular dos neurônios NADPH-d positivos, localizados no córtex visual primário, apresentava-se reduzida em animais subnutridos. Díaz-Cintra et al. (1990) e García-Ruiz et al. (1993), avaliaram ratos submetidos a uma subnutrição, contendo teores de caseína 8% e 6%, respectivamente. Estes, apesar de não terem verificado alterações no tamanho dos eixos e, do perímetro do corpo celular de células piramidais, aos 30 dias, observaram redução desses neurônios aos 220 dias de vida, comparativamente aos respectivos controles.

Tal fato poderia indicar que em curto prazo, o corpo celular dos neurônios NADPH-d positivos seria capaz de resistir ao impacto das dietas hipoprotéicas à base de caseína (proteína de alto valor biológico). Entretanto, neste estudo, já aos 42 dias foram notadas redução da área desses neurônios, sendo que, deste momento até a fase final do período experimental aqui proposto (60 dias), este aspecto não mostrou diferenças consideradas significantes.

Segundo Yan et al. (1994), ao nascimento, a atividade histoquímica da NADPH-d em ratos aparece apenas nas camadas V e VI. Ao final da primeira semana pós-natal, essa atividade se expande, tornando-se mais intensa nas camadas II/III. Durante a segunda e terceira semana a atividade enzimática se estabiliza permanecendo até a idade adulta. À medida que o córtex envelhece, há um declínio geral na intensidade dessa atividade (YAN et al., 1994; KUO et al., 1997). Neste estudo, estes neurônios foram encontrados em menor quantidade, distribuídos de maneira difusa por toda a área cortical, concentrando-se, principalmente, nas lâminas II (granular externa) e VI (multiforme). Esta localização está de acordo com o observado por Scherer-Singler (1983).

Ao se analisar os animais dos grupos Rp42 e Rt60, estes não apresentam recuperação comparativamente àqueles nutridos (N42 e N60), independentemente se a renutrição foi precoce ou tardia. Para Gonçalves (2001), a reabilitação nutricional posterior, não é capaz de reverter o dano na formação do sistema nervoso central e na síntese e liberação de neurotransmissores.

Avaliando-se as áreas médias do perfil dos neurônios nitrérgicos, respectivamente àquelas observadas para os animais dos grupos S42 e S60, permitem inferir que, a subnutrição proteica afeta gravemente este parâmetro e que, o período de tratamento aqui avaliado (aproximadamente 20 dias), pode não ter sido capaz de restabelecer a área dos neurônios corticais, independentemente se esta recuperação iniciou-se em uma fase mais precoce (de 21 até os 42 dias) ou tardia (a partir dos 42 até os 60 dias).

Em linhas gerais, a partir dos resultados deste estudo, infere-se que os animais dos grupos S42 e S60 apresentaram as menores médias que aquelas observadas para os animais dos grupos N42 e N60, sendo que, os animais dos grupos Rp42 e Rt60 apresentaram médias intermediárias. Padrão este, observado para praticamente todos os parâmetros aqui avaliados. De um modo geral, neste estudo, a subnutrição protéica afeta gravemente os aspectos morfológicos dos animais, porém, nenhum parâmetro mostrou diferenças tão fortemente acentuadas como aquelas observadas para os pesos corporais. Ainda, observa-se que os animais dos grupos renutridos (Rp42 e Rt60), recuperam os valores de normalidade, para os parâmetros antropométricos encefálicos.

Para Williams et al. (1989), cortes microscópicos corados para evidenciar corpos celulares de neurônios corticais onde a laminação é distinguida, como o método de Nissl aqui utilizado, detalhes mais finos e mais significantes da real organização cortical, como a arranjo morfofisiológico, a distribuição espacial das células e as prováveis interações neuronais, não são tão aparentes. Tais detalhes dependem de técnicas neuro-histoquímicas e da microscopia eletrônica. Entretanto, uma abordagem da citoarquitetura do córtex cerebral foi importante para avaliar os efeitos da subnutrição protéica pré e pós-natal e, da possível recuperação baseada em uma renutrição iniciada em períodos mais precoces ou tardios.

Todavia, a subnutrição protéica severa experimental é um procedimento que, se por um lado assegura uma fidedignidade quanto aos seus efeitos promovidos em diversos sistemas como, por exemplo, na parte central do sistema nervoso, mais especificamente por outro, dificulta sobremaneira a obtenção dos animais dos grupos S42 e S60 pela debilidade desses animais, e ainda, dos animais N60, devido aos quadros de litíase renal observados. Por se tratar-se de um procedimento que restringe, parcialmente, a oferta de caseína, a principal proteína estrutural, o organismo desses animais padece com a perda de aminoácidos estruturais indispensáveis, uma vez que, os animais dessas ninhadas, principalmente as matrizes, são tremendamente susceptíveis a intercorrências como, a alteração da temperatura e de cheiro do ambiente, barulho excessivo, mudança de tratador, bem como as alterações na alimentação, etc. Como resultado, são observados casos de mães alimentando-se dos próprios filhotes, ou ainda, de filhotes alimentando-se de outros, durante e após serem desmamados.

Estudos concernentes à pesquisa sobre subnutrição nos diferentes órgãos e tecidos têm apresentado resultados controversos, que têm sido atribuídos às diferentes maneiras pelas quais se desenvolvem os protocolos experimentais para subnutrição. Para Nóbrega, existe uma complexidade dos problemas enfrentados por estudos relacionados à subnutrição e o sistema nervoso. A importância da seleção do modelo animal a ser utilizado, as diferenças de

respostas entre as várias espécies de animais, os tipos de privação alimentar que são impostos, e, finalmente, os múltiplos métodos de apreciação, entre os quais a precisão no processamento dos tecidos, a natureza dos métodos de análise e quantificações e, a devida acuidade na comparação dos resultados, tudo isso, torna imprescindível um correto ajuizamento sobre as afirmações e negações contidas nestes múltiplos relatos gerados até o momento.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada e os resultados ora apresentados acerca das repercussões morfológicas determinadas pela subnutrição no córtex cerebral e nos seus elementos constituintes, e da possível reversibilidade dos efeitos causados pela renutrição precoce ou tardia, é lícito concluir-se que:

1. Os animais dos grupos subnutridos exibiram características morfológicas e metabólicas diversas em relação aos seus respectivos controles nutridos (N42 e N60);
2. A subnutrição afetou de maneira substancial os parâmetros aqui analisados, porém, nenhum deles foi tão alterado, como o peso corporal, principalmente nas fases do desmame e da eutanásia;
3. Comparativamente aos grupos controle (N42 e N60), as menores médias para todos os parâmetros foram verificadas nos animais subnutridos (grupos S42 e S60), ao passo que os animais renutridos (grupos Rp42 e Rt60) exibiram médias intermediárias;
4. Com a recuperação protéica, os animais dos grupos Rp42 e Rt60 não recuperaram os parâmetros de peso corporal, comprimento naso-anal, circunferência abdominal e espessura cortical; entretanto, muito embora tivessem restabelecido o peso encefálico e a maioria das dimensões encefálicas, o eixo látero-lateral e às circunferências maior e menor não apresentaram dimensões compatíveis com a normalidade;
5. A razão *peso encefálico/peso corporal* mostrou que o encéfalo parece não sofrer reduções drásticas com a subnutrição. O índice de Lee apresentou-se de maneira crescente nos animais subnutridos e, decrescente nos respectivos controles, tendendo ao equilíbrio nos indivíduos renutridos precoce e tardiamente;
6. O metabolismo dos animais subnutridos exhibe alterações graves ou mesmo irreparáveis nos parâmetros ingestão alimentar e hídrica, bem como na excreção de fezes e urina, sendo que estes parâmetros não são recuperados pela renutrição;

7. Quanto às razões *ingestão alimentar/peso corporal*, os animais subnutridos (S60) e renutridos (Rt60) exibem um apetite mais acentuado, ingerindo proporcionalmente ao seu peso corporal, mais ração;
8. Não houve diferença entre os grupos experimentais (N60, S60, Rt60), quanto à *excreção de fezes/ingestão alimentar*;
9. Referente à *ingestão hídrica/peso corporal*, os animais do grupo Rt60, principalmente no período II (momento ao qual troca-se a dieta) ingerem mais líquido com relação ao S60;
10. Comparando-se com o grupo controle (N60), há uma diminuição das razões *ingestão hídrica/ingestão alimentar* e *excreção de urina/ingestão hídrica* nos animais do grupo S60, esta última, apresentando-se também menor nos animais do grupo Rt60;
11. A subnutrição não alterou o número e a densidade dos neurônios, tampouco a estrutura da laminação cortical; porém, o número dessas células tende a diminuir com o avançar da idade, menos nas lâminas piramidal interna e multiforme;
12. O parâmetro densidade de volume não foi afetado pela subnutrição, exceto na lâmina multiforme, onde detectou-se uma diminuição de 42 para 60 dias;
13. A área dos neurônios corticais foi afetada de maneira substancial pela subnutrição, embora as lâminas granulares dos animais renutridos (Rp42 e Rt60) tenham conseguido alguma recuperação;
14. Muito embora os grupos renutridos precoce e tardio não recuperem valores compatíveis com a normalidade no que se refere à área neuronal, a renutrição precoce foi mais eficiente do que a tardia nas lâminas piramidal externa e multiforme;
15. Do ponto de vista estrutural, não há dúvidas de que a subnutrição imposta no início da vida repercute sobre parâmetros morfológicos, como a área dos neurônios NADPH-d positivos e os tratamentos não foram eficazes para o restabelecimento destas médias.

Assim, o modelo de restrição protéica pré e pós-natal, imposta aos animais durante o período crítico de rápido crescimento e desenvolvimento encefálico, foi suficiente para verificar alterações morfológicas como redução da espessura cortical e das áreas dos neurônios corticais e nitrérgicos. Em linhas gerais, a subnutrição não afeta parâmetros como o número e a densidade de neurônios do córtex cerebral. A intervenção nutricional foi totalmente efetiva apenas no retorno das medidas antropométricas relativas ao encéfalo como: o peso e as dimensões encefálicas e que, quanto mais precoce se iniciar a renutrição melhor são os resultados. Diante de todos os resultados e das proposições realizadas, ainda assim, não se descarta a hipótese de que a subnutrição protéica, em determinados períodos, seja responsável por alterações irrecuperáveis no córtex cerebral de ratos Wistar.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- AHMAD, G.; RAHMAN, A. Effects of undernutrition and protein malnutrition on brain chemistry of rats. **The Journal of nutrition**, v. 105, n. 9, p. 1090-1103, 1975.
- ANCONA LOPES, F. **Comportamento do magnésio plasmático e tecidual na má nutrição proteica; estudo experimental no rato**. 1973. 110 f. Tese (Doutorado em Nutrição) – Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu. Botucatu, 1973.
- AKAMATSU, F. E. **Características estruturais, ultra-estruturais e morfométricas do plexo subepicárdio de ratos submetidos à desnutrição protéica pré e pós-natal e a renutrição pós-natal**. 2006. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- AKSOY, M. H.; VARGEL, I.; CANTER, I. H.; ERK, Y.; SARGON, M.; PINAR, A.; GÜLER TEZEL, G. A new experimental hypertrophic scar model in guinea pigs. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 26, p. 388-396, 2002.
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. F.; BEL, E. A. D.; BRENTGANI, L. G.; OLIVEIRA, M. T. M.; ISSA, J. P. M. Trigeminal nitric oxide synthase expression correlates with new bone formation during distraction osteogenesis. **Calcified tissue international**, v. 82, p. 309-315, 2008.
- AMARAL, J.; LEITE, A. J. M.; CUNHA, A. J. L. A.; VICTORA, C. G. Impact of IMCI health worker training on routinely collected child health indicators in Northeast Brazil. **Health Policy and Planning**, v. 20, p. 42-48, 2005. Supplement 1.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2002, 388p.
- ANGULO-COLMENARES, A. G.; VAUGHAN, D. W.; HINDS, J. W. Rehabilitation following early malnutrition in the rat: body weight, brain size, and cerebral cortex development. **Brain Research**, v. 169, p. 121-138, 1979.
- ARAÚJO, M. S. **Análise Qualitativa e Quantitativa e Neurônios NADPH-d Positivos no Córtex Visual de Ratos Adultos**. 1998, 85 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.

* Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. rev. atual. ampl. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84 P.

- BAPTISTA, J. S. **Repercussões morfológicas no timo de ratos jovens submetidos à desnutrição protéica e à renutrição precocemente corrigida**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BARKER, D. J.; HALES, C. N.; FALL, C. H.; OSMOND, C.; PHIPPS, K.; CLARK, P. M. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, v. 36, n.1, p. 62-67, 1993.
- BATISTA-FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. S181-S191, 2003. Suplemento 1.
- BAUTZ, W. G. **Repercussões morfológicas da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal no reparo da mucosa e do osso alveolar da mandíbula de ratos após a extração do primeiro molar**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 860 p.
- BEDI, K. S. Effects of undernutrition during early life on granule cell number in the rat dentate gyrus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 311, p. 425-433, 1991.
- BEDI, K. S. Undernutrition of rats during early life does not affect the total number of cortical neurons. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 342, p. 596-602, 1994.
- BEDI, K. S.; BHIDE, P. G. Effects of environmental diversity on brain morphology. **Early Human Development**, v. 17, p. 107-143, 1988.
- BEDI, K. S.; WARREN, M. A. The effects of undernutrition during early life on the rat optic nerve fiber number and size-frequency distribution. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 219, n. 2, p. 125-132, 1983.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **The Journal of Endocrinology**, v. 40, n.4, p. 527-528, 1968.
- BINOTTI, C. B. **Repercussões morfológicas da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre o nervo alveolar inferior de ratos jovens**. 2003. 94 f. Tese

(Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

BITTENCOURT, S. A.; NIQUINI, R. P.; REIS, A. C.; LEAL, M. A.; Care for malnourished children: an analyses of Brazilian National Health Service Hospital Information System Data. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 9, n. 3, p. 2009.

BOLDRINI, S. C. **Efeitos da desnutrição pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre o crescimento craniofacial de ratos Wistar: análise craniométrica morfoquantitativa e ultra-estrutural**. 2003. 69 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

BONATTO, F.; POLYDORO, M.; ANDRADES, M. E.; CONTE DA FROTA JR., M. L.; DAL-PIZZOL, F.; ROTTA, L. N. Effects of maternal protein malnutrition on oxidatives markers in the Young rat córtex and cerebellum. **Neuroscience Letters**, v. 406, n. 3, p. 281-284, 2006.

BORBA, J. M.; ARAUJO, M. S.; PICANÇO-DINIZ, C. W.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; GUEDES, R. C. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH- diaphorese-containing neurons in the rat visual córtex after early malnutrition. **Brain Research Bulletin**, v. 15, p. 193-201, 2000.

BORSATTO, E. M. **Desnutrição Protéica: avaliação *in vitro* da capacidade proliferativa de progenitores grânulo-monócitos da medula óssea de camundongos**. 1999. 83 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BRAGA, L. M. G. M. O animal como um modelo experimental: noções básicas de genética , sanidade, alojamento e manutenção de animais de laboratório. In: Feijó, A. G. S.; Braga, L. M. G. M.; Pitrez, P. M. C. (org.). **Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2010. 421 p.

BRANDÃO, M. C. S.; ANGELIS, R.C.; SOUZA, R. R.; FRÓES, L. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and post-natal protein energy deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weanling rats. **Nutrition Research**, v. 75, p. 7-15, 2003.

BROCK, J. W; PRASAD, C. Alterations in dendritic spine density in the rat brain associated with protein malnutrition. **Brain Research. Development Brain Research**, v. 66, p. 266-269, 1992.

BRODY, H. Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 02, p. 511-556, 1995.

BROWN, J. L.; POLLITT, E. Malnutrition, poverty and intellectual development. **Scientific American**, v. 274, p. 2, 1996.

CAMERON, H. A.; MCKAY, R. D. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. **The Journal Comparative Neurology**, v. 435, n. 4, p. 406-417, 2001.

CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R.; ANGELIS, R. C.; FURNES, J. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pré- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell and Tissue Research**, v. 310, p. 1-7, 2002.

CAVALLI, M. A. Avaliação morfoquantitativa dos efeitos da subnutrição e da renutrição proteica no processo condilar da mandíbula de ratos Wistar: uma correlação com a expressão do receptor de insulina. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CHANDRA, R. K. Protein-energy malnutrition and immunological responses. **The Journal of Nutrition**, v. 122, p. 597-600, 1992.

CHANDRA, R. K. Nutrition & Immunity. **Clinical Immunology**, v. 25, p. 1-10, 1991.

CHASE, H. P.; MARTIN, H. P. Undernutrition and child development. **New Engl. J. Med.**, v. 282, p. 933-939, 1970.

CLARK, G. M.; ZAMENHOF, S.; VAN MARTHENS, E.; GRAUEL, L.; KRUGER, L. The effects of prenatal malnutrition on dimensions of cerebral cortex. **Brain Research**, v. 54, p. 397-402, 1973.

CLOS, J.; FAVRE, C.; SELME-MATRAT, M.; LEGRAND, J. Effects of undernutrition on cell formation in the rat brain and specially on cellular composition of the cerebellum. **Brain Research**, v. 123, p. 13-26, 1977.

COLONNIER, M. The tangential organization of the visual cortex. **Journal of Anatomy**. v. 98, p. 327-344, 1964.

- CONRADI, N. G.; SJÖSTRÖM, A.; RYDENHAG, B. Functional development of the visual system in normal and protein-deprived rats. VIII. Post-natal development of optic nerve axons. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 136, n. 4, p. 597-603, 1989.
- CORDERO, M. E.; TREJO, N.; GARCIA, E.; BARROS, T.; COLOMBO, M. Dendritic development in the neocortex of adult rats following a maintained early prenatal and/or postnatal life undernutrition. **Early Human Development**, v. 14, p. 245-258, 1986.
- CORDERO, M. E.; VALENZUELA, C. Y.; RODRIGUEZ, A.; ABOITIZ, F. Dendritic morphology and orientation of pyramidal cells of neocortex in two groups of early postnatal undernourished-rehabilitated rats. **Brain Research. Development Brain Research**, v. 142, n. 1, p. 37-45, 2003.
- CORNBLATH, D. R.; BROWN, M. J. Influence of malnutrition on developing rat peripheral nerves. **Experimental Neurology**, v. 99, n.2, p. 403-411, 1988.
- CRAGG, B. G. The development of cortical synapses during starvation in the rat. **Brain**, n. 95, p. 143-150, 1972.
- DAUBER, W. **Dicionário ilustrado de Anatomia de Feneis**. 9 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- DAVISON, A. N.; DOBBING, J. Myelination as a vulnerable period in brain development. **British Medical Bulletin**, v. 22, p. 40-44, 1966.
- DELESSE, M. A. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 25, p. 544-545, 1847.
- DESAI, M.; CROWTHER, N. J.; LUCAS, A.; HALES, C. N. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. **British Journal of Nutrition**, v. 76, p. 591-603, 1996.
- DESAMI, M.; BABU, J.; ROSS, M. G. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and post weaning over nutrition. **American Journal of Physiology**, v. 293, n. 6, p. R2306-2314, p. 2007.
- DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; ORTEGA, A.; KEMPER, T.; MORGANE, P. J. Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of the visual cortex in rats of three age groups. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 292, p. 117-126, 1990.

DÍAZ-CINTRA, S.; GARCIA-RUIZ, M.; CORKIDI, G.; CINTRA, L. Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cell in rats of four ages. **Brain Research**, v. 1, n. 2, p. 117-126, 1994.

DIAZ DEL CASTILLO, E. Consideraciones sobre desnutrición materna y desnutrición in útero. **Ginecología y Obstetricia de México**, v. 37, p. 103-118, 1975.

DICKERSON, J. W. T.; HUGHES, P. C. R. E McNULTY, P. A. The growth and development of rats given a low-protein diet. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 15, p. 567-576, 1972.

DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain: the use of animal models to elucidate the human problem. **Psychiatry Neurologia Neurochirurgia**, v. 74, p. 433-442, 1971.

DOBBING, J. **Vulnerable periods of brain development**, in: Lipids, Malnutrition and the Developing Brain, CIBA Foundation Symposium, Elsevier, Amsterdam, p. 9-29, 1972.

Disponível em:

<<http://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=O8x25Dnw75YC&oi=fnd&pg=PA9&dq=Vulnerable+periods+in+developing+brain>> Acesso em: 10/11/2012.

DOBBING, J.; HOPEWELL, J. W.; LYNCH, A. Vulnerability of developing brain. VII. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. **Experimental Neurology**, v. 32, p. 439-447, 1971.

DOBBING, J.; SANDS, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. **Early Human Development**, v. 311, p. 79-83, 1979.

EAYRS, J. T.; HORN, G. The development of cerebral cortex in hypothyroid and starved rats. **Anatomical Record**, v. 121, p. 53-61, 1955.

ERHART, E. A. **Neuroanatomia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1974. 406 p.

FALCÃO-TEBAS, F.; TOBIAS, A. T.; BENTO-SANTOS, A.; SANTOS, J. A.; VASCONCELOS, D. A. A.; FIDALGO, M. A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; LEANDRO, C. G. Efeitos do treinamento físico durante a gestação sobre a evolução ponderal, glicemia e colesterolemia de ratos adultos submetidos à desnutrição perinatal. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, n. 1, p. 58-62, 2012.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.

Undernourishment around the world. 2006. Disponível em:

<<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0750e/a0750e02.pdf>>. Acesso em: 9 Jul. 2012.

FERNÁNDEZ, V.; PASCUAL, R.; RUÍZ, S. Early life environmental deterioration, nutrition and ontogenesis of the motor cortex in the rat: a Golgi study. **Biology of the Neonate**, v. 64, p. 245-253, 1993.

FERREIRA, A. B. H. **Mini-aurélio: o dicionário da língua portuguesa**. 8. ed. Curitiba: Positivo, 2010. 960 p.

FIACCO, T. A.; ROSENE, D. L.; GALLER, J. R.; BLATT, G. J. Increased density of hippocampal kainate receptors but normal density of NMDA and AMPA receptors in a rat model of prenatal protein malnutrition. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 456, n. 4, p. 350-360, 2003.

FISH, I.; WINICK, M. Effect of malnutrition on regional growth of the developing rat brain. **Experimental Neurology**, v. 25, n. 4, p. 534-540, 1969.

FUENTES, M. A.; OPPERMAN, L. A.; BELLINGER, L. L.; CARLSON, D. S.; HINTON, R. J. Regulation of cell proliferation in rat mandibular condylar cartilage in explant culture by insulin-like growth factor-1 and fibroblast growth factor-2. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 643-654, 2002.

GAETANI, S.; MENGHERI, E.; ROSSI, A.; SPADONI, M. A.; TOSCH, G. Long term protein deficiency in adult rats. **Neurochemical Research**, v. 2, p. 439-448, 1977.

GARCÍA-RUIZ, M.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; CORKIDI, G. Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. **Brain Research**, v. 625, p. 203-212, 1993.

GOMES, O. A.; CASTELUCCI, P.; FONTES, R. B. V.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: A quantitative morphological study. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 126, n. 127, p. 277-284, 2006.

GONÇALVES, L. A. **Efeito da restrição alimentar e do envelhecimento sobre o sistema colinérgico cortical de ratos**. 2001. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

GOPINATH, G.; ROY, S.; KARMARKAR, M. G. Effect of undernutrition and rehabilitation on the post-natal growth of skeletal muscle and nerve in the rat. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 77, p. 702-712, 1983.

GRAHAM, G.; MORALES, E. Studies in infantile malnutrition. I. Nature of the problems in Peru. **The Journal of Nutrition**, v. 79, p. 479-487, 1963.

GUNDERSEN, H. J. G. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in the memory of William R. Thompson. **Journal of Microscopy**, v. 143, p. 3-45, 1986.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of Microscopy**, v.147, p. 229-263, 1987.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B.; KIEU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 3, n. 193, p.199-211, 1999.

HABACUQUE, T. S. S. **Aspectos estruturais, ultraestruturais e quantitativos dos efeitos da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal no plexo ganglionar da traquéia de ratos**. 2010. 141 f Dissertação (Mestrado em Ciências), - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, p. 595-601, 1992.

HALL, A. G.; KHANH, L. N.; SON, T. H.; DUN, N. Q.; LANSDOWN, R. G.; DAR, D. T.; HANH, N. T.; MOESTUE, H.; KHOI, H. H.; BUNDY, D. A. Partnership of child development. An association between chronic undernutrition and educational test scores in Vietnamese children. **European Journal Clinical Nutrition**, v. 55, n .9, p. 801-804, 2001.

HAUG, H.; EGGERS, R. Morphometry of the human cortex cerebri and corpus striatum during aging. **Neurobiology of Aging**, v. 12, p. 336-338, 1991.

HEDLEY-WHYTE, E. T.; MEUSER, C. S. The effect of undernutrition myelination of rat sciatic nerve. **Laboratory Investigation**, v. 24, p. 156-161, 1971.

HEDLEY-WHYTE, E. T. Myelination of rat sciatic nerve: comparison of undernutrition and cholesterol biosynthesis inhibition. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 32, n 2, p. 284-302, 1973.

HSUEH, A. M.; AGUSTIN, C. E.; CHOW, B. F. Growth of young rats after differential manipulation of maternal diet. **The Journal of Nutrition**, v. 91, p. 195-200, 1967.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. Three-dimensional measurement in microscopy. In: ____ **Unbiased Stereology**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2005. 246 p.

INSTRULAB . Instrumentos para laboratório. Gaiolas metabólicas para roedores, 2012
Disponível em: < <http://www.instrulab.com.br/detalhes.php?id=32>> Acesso em: 15 nov. 2012.

JAHOOOR, F.; BADALOO, A.; REID, M.; FORRESTER, T. Protein metabolism in severe childhood malnutrition, **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 28, p.87-101, 2008.

JOSHI, S.; GAROLE, V.; DAWARE, M.; GIRIGOSAVI, S.; RAO, S. Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in Wistar rats. **Metabolism - Clinical and Experimental**, v. 52, v. 1, p. 13-18, 2003.

KFOURI, J. R. N.; TRINDADE, C. E. P.; NÓBREGA, F. J.; TONETE, S. S. Q.; MONTE-NEGRO, M. R. G. Metabolismo (lipídios e proteínas) e histopatologia do cérebro de ratos recém-nascidos, jovens e adultos, submetidos à desnutrição protéico-calórica, tipo marasmo. **Jornal de Pediatria**, v. 42, p. 28-39, 1977.

KIRSCH, R. E.; SAUNDERS, S. J.; BROCK, J. F. Animal models and human protein-caloric malnutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 21, p. 1225-1228, 1968.

KISTLER, D.; HAFEMANN, B.; SCHMIDT, K. A model to reproduce predictable full-thickness burns in an experimental animal. **Burns, Including Thermal Injury**, v. 14, p. 297-302, 1988.

KNOWLES, R. G.; PALACIOS, M.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 86, p. 5159-5162, 1989.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin: Discovery of the natural endogenous ligand for the growth-hormone secretagogue receptor. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 12, p. 118-122, 2001.

KRSEK, M.; ROSICKÁ, M.; PAPEZOVÁ, H.; KRIZOVÁ, J.; KOTRLÍKOVÁ, E.; HALUZÍK, M.; JUSTOVÁ, V.; LACINOVÁ, Z.; JARKOVSKÁ, Z. Plasma ghrelin levels and malnutrition: a comparison of two etiologies. **Eating and Weight Disorders**, v. 8, p. 207-211, 2003.

KUNZ, C.; LÖNNERDAL, B. Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 37-46, 1990.

KUO, H.; HENEMIHLE, J.; INGRAM, D. K. Nitric oxide synthase in rat brain: age comparisons quantitated with NADPH-diaphorase histochemistry. **The Journal of Gerontology**, v. 52A, n. 3, p. B146-B151, 1997.

LAJTHA, A.; DUNLOP, D.; PATLAK, C.; TOTH, J. Compartments of protein metabolism in developing brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 561, p. 491-501, 1979.

LEME, J. A. C. A.; SILVEIRA, R. F.; MANCHADO-GOBATTO, F. B.; ALMEIDA-JUNIOR, C. C.; MELLO, M. A. R.; LUCIANO, E. Effects of physical training and metformin treatment on endocrine-metabolic aspects of male and female obese rats. **Revista Digital - Buenos Aires - Ano 13** n. 121, p. 1-1 2008. < Disponível em: <http://www.efdeportes.com/>>. Acesso em: 4 nov. 2012.

LEUBA, G.; RABINOWICZ, T. Long-term effects of post-natal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. I. Cellular densities, cortical volume and total number of cells. **Experimental Brain Research**, v. 37, p. 283-298, 1979.

LEVITSKY, D. A.; STRUPP, B. J. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2212S-2220S, 1995.

LEWIS, P. D.; PATEL, A. J.; BALAZS, R. Effects of undernutrition on cell generation in the rat hippocampus. **Brain Research**, v. 168, p. 186-189, 1979.

LIBERTI, E. A.; FONTES, R. B. V.; FUGGI, V. M.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R. Effects of combined pre- and post-natal protein deprivation on the myenteric plexus of the esophagus of weanling rats: A histochemical, quantitative and ultrastructural study. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 26, p. 3598-3604, 2007.

LISTER, J. P.; BLATT, G. J.; DEBASSIO, W. A.; KEMPER, T. L.; TONKISS, J.; GALLER, J. R. 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.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins 1–4. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1537S–1543S, 2003.

LUIZ, L. F. **Repercussões morfológicas da subnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal na mucosa lingual de ratos Wistar nas fases púberes e adulta: avaliações estrutural e da expressão do IGF-I e IGF-IR, da insulina e seu receptor.** 2012, 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1993. 363 p.

MARÍN, M. C.; DE TOMÁS, M. E.; SERRES, C.; MERCURI, O. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1017-1024, 1995.

MARTOJA, R.; MARTOJA-PIERSON, M. **Técnicas de histologia animal.** Barcelona; Toray-Masson, 1970. 350 p.

MATHESON, D. F. Some quantitative aspects of myelination of the optic nerve in rat. **Brain Research**, v. 24, p. 257-269, 1970.

MCCALL, A. L. Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. **European Journal of Pharmacology**, v. 490, p. 147-158, 2004.

MELLANDER, O.; OLSSON, N. The influence of peptide bound calcium and phosphorus on bone calcification in rickets. **Boletín Medico del Hospital Infantil de Mexico**, v. 13, p. 243-246, 1956.

MIRANDA, C. M. **Repercussões morfológicas da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre a lâmina epifisial e a cartilagem de ossos longos de ratos Wistar.** 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MONTE, C. M. G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. **Journal of Pediatrics**, v. 76, p. 285-297, 2000.

MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. **Estudos avançados**, v. 9, p. 1995-1207, 1995.

MONTEIRO, C. A. Os determinantes da desnutrição infantil no Vale do Ribeira. **Cadernos de pesquisa**, v. 29, p. 57-75, 1979.

MONTEIRO, J. S.; GUEDES, R. C. A.; CASTRO, R. M.; CABRAL-FILHO, J. E. Psychosocial stimulation and brain plasticity in malnourished individuals. **Revista brasileira de saúde maternal e infantil**, v. 2, n. 1, p. 15-22, 2002.

MONTEIRO, R.; BRANDAU, R.; GOMES, W. J.; BRAILE, D. M. Trends in animal experimentation. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 24, n. 4, p. 506-513, 2009.

MORGAN, B. L. G.; WINICK, M. Pathological effects of malnutrition on the Central Nervous System. In: SIDRANSKY, H. (Ed.) **Nutritional pathology; pathobiochemistry of dietary imbalances**. New York: Marcel Dekker, 1985. 400p.

MORGANE, P. J.; MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, R.; HALL, H.; BRONZINO, J. D.; KISSANE, J.; HAWRYLEWICS, E.; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 2, p. 137-230, 1978.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 17, n.1, p. 91-128, 1993.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 471-483, 2002.

MORRIS, T. J.; VICKERS, M.; GLUCKMAN, P.; GILMOUR, S.; AFFARA, N. Transcriptional profiling of rats subjected to gestational undernourishment: implications for the developmental variations in metabolic traits. **PLoS One**. v. 4, n. 9, p. e7271, 2009.

NEWSHOLME, E. A.; LEECH, A. R. **In biochemistry for the medical sciences**. Chichester: John W., 1984. 952 p.

NOBACK, C. R.; EISENMAN, L. M. Some effects of protein-calorie undernutrition on the developing central nervous system of the rat. **Anatomical Record**, v. 201, n. 1, p. 67-73, 2005.

- NÓBREGA, F. J. **Desnutrição intrauterina e pós-natal**. Panamed Editorial, 2. ed. 1986. 567 p.
- OLDFORS, A. Nerve fibre degeneration of the central and peripheral nervous system in severe protein deprivation in rats. **Acta Neuropathology**, v. 54, p. 121-127, 1981.
- OLIVEIRA, C. N.; COSTA, R. G.; RIBEIRO, R. L. Obesidade Abdominal associada a fatores de risco a saúde em adultos. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 3, n. 1, p. 34-43, 2008.
- OLIVEIRA, F. **Características histoquímicas das fibras musculares do m. Gastrocnêmio de ratos wistar desnutridos submetidos à lesão térmica**. 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- OZANNE, S. E. Metabolic programming in animals. **British Medical Bulletin**, v. 60, p. 143-52, 2001.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**: Hard Cover Edition. 6 ed. Editora: Academic press. 2007. 456p.
- PEREIRA, S. M.; BEGUM, A. Studies in the prevention of vitamin A deficiency. I. **The Indian Journal of Medical Research** , v. 56, n. 3, p. 362-369, 1968.
- PETRY, C. J.; OZANNE, S. E.; HALES, C. N.; Programming of intermediary metabolism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 185, n 1-2, p. 81-91, 2001.
- PICANÇO-DINIZ, C. W.; ARAUJO, M. S.; BORBA, J. M. C.; GUEDES, R. C. A. NADPH-diaphorese containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, p. 35-48, 1998.
- PIMSTONE, B. L.; BARBEZAT, G.; HANSENS, J. D.; MURRAY, P. Studies on growth hormone secretion in protein-calorie malnutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 21, p. 482-487, 1968.
- PINE, A. P.; JESSOP, N. S. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 71, p. 13-27, 1994.

PLATT, B. S.; STEWART, R. J. C. Effects of protein-calorie deficiency on dogs 1. Reproduction, growth and behaviour. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 10, p. 3-24, 1968.

PLOCHER, T. A.; POWLEY, T. L. Maintenance of Obesity Following Hypophysectomy in the Obese-Hyperglycemic Mouse (ob/ob). **The Yale Journal of Biology and Medicine**. v. 50, p. 291-300, 1977.

RACELA, A. S.; GRADY, H. J.; HIGGINSON, J.; SVOBODA, D. J. Protein deficiency in rhesus mokeys. **The American Jouranl of Pathology**, v. 49, p. 419-443, 1966

RANA, S. V.; CHOPRA, J. S.; MEHTA, S.; CHAND, U. K.; SHARMA, U. Electrophysiological and histopathological changes in peripheral nerves of postnatally undernourished and rehabilitated young rhesus monkey. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 29, p. 385-390, 1991.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. Ain-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**., v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RIBEIRO, M. M. **Efeitos do destreinamento após período de treinamento intervalado sobre os níveis de adiposidade em ratos Wistar**. 2010. 63 f. Monografia (Bacharelado em Educação física) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

ROMEIS, B. **Mikroskopische technik**. München, Wien: R. Ouldenbourg Verlag. 1968.

ROSIWAL, A. Ueber geometrische Gesteinsanalysen. **Verh. K. Geol. Reichert, Wien**, v. 13, p. 143-175, 1898.

SALAS, M.; DIAZ, S.; NIETO, A. Effects of neonatal food deprivation on cortical spines and dendritic development of the rat. **Brain Research**, v. 73, p. 139-144, 1974.

SANTER, R. M.; CONBOY, V. B. Prenatal undernutrition permantly decreases enteric neurons number and sympathetic innervation of Auerbach´s plexus in rat. **Journal of Anatomy**, v. 168, p. 57-62, 1988.

SANTER, R. M. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 49, p. 115-121, 1994.

SANZ-SAMPELAYO, M. R.; FENOLLA, J.; EXTREMERA, F. G. Factors affecting the food intake, growth and protein utilization in the *Helix aspersa snail*. Protein content of the diet and animal age. **Laboratory Animals**, v. 25, p. 291-298, 1991.

SAVINO, W.; DARDENNE, N.; VELOSO, L. A.; SILVA-BARBOSA, S. D. The thymus is a common target in malnutrition and infection. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 11-16, 2007.

SAWAYA, A. L. Desnutrição: consequências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. **Estudos Avançados**, v. 20, p. 147-158, 2006.

SCHÄFER, K.; FRIEDE, R. L. The onset and rate of myelination in six peripheral and autonomic nerves of the rat. **Journal of Anatomy**, v. 159, p. 181-195, 1988.

SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S. R.; KIMURA, H.; MCGEER, E. G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 9, n. 3, p. 229-234, 1983.

SCORZA, F. A.; ARIDA, R. M.; ALBUQUERQUE, M.; CAVALHEIRO, E. A. Epilepsy and Hypertension. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 4, p. 219-224, 2006.

SHIMADA, M.; YAMANO, T.; NAKAMURA, T.; MORIKAWA, Y.; KUSUNOKI, T. Effects of maternal malnutrition on matrix cell proliferation in the cerebrum of mouse embryo: an autoradiographic study. **Pediatric Research**, v. 11, p. 728-732, 1977.

SHRADER, R. E.; ZEMAN, F. J. Effect of maternal protein deprivation on morphological and enzymatic development of neonatal rat tissue. **The Journal of Nutrition**, v. 99, p. 401-412, 1969.

SIASSI, F.; SIASSI, B. Differential effects of protein-calorie restriction and subsequent repletion on neuronal and non neuronal components of cerebral cortex in newborn rats. **The Journal of Nutrition**, v. 103, p. 1625-1633, 1973.

SIMA, A. Studies on fiber size in developing sciatic nerve and spinal roots in normal, undernourished and rehabilitated rats. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 91, p. 1-55, 1974a Supplement 406.

- SIMA, A. Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibres of ventral and dorsal roots and optic nerve in normal, undernourished and rehabilitated rats. An ultrastructural morphometric study. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 91, p. 1-38, 1974b Supplement 410.
- SIMA, A.; SOUNDER, P. The effect of early undernutrition on the caliber spectrum of the rat optic nerve. A morphometric ultrastructural study. **Acta Neuropathologica**, v. 28, p. 151-160, 1974.
- SIMÕES, L. S.; BOLDRINI, S. C.; BINNOTI, C. B.; CAPOTE, T. S. O.; LIBERTI, E. A. Impact of pre and postnatal protein energy deprivation on structure of the trigeminal ganglion of weanling rats. **The Open Nutrition Journal**, v. 2, p. 118-121, 2008.
- SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. **Brain Research**, v. 28, p. 85-95, 1971.
- SNYDER, S. H. Nitric oxide and neurons. **Current opinion in Neurobiology**, v. 2, p. 323-327, 1992.
- SOTO-MOYANO, R.; FERNANDEZ, V.; SANHUEZA, M.; BELMAR, J.; KUSCH, C.; PEREZ, H. Effects of mild protein prenatal malnutrition and subsequent postnatal nutritional rehabilitation on noradrenaline release and neuronal density in the rat occipital cortex. **Brain Research. Development Brain Research**, v. 116, n. 1, p. 51-58, 1999.
- STANDRING, S. **Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice**. 40th ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2008.
- STEWART, R. J. C.; MERAT, A.; DICKERSON, J. W. T. Effects of a low protein diet in mother rats on the structure of the brain of the offspring. **Biology of the Neonate**, v. 25, p. 125-134, 1974.
- STEWART, R. J. C.; PREECE, R. F.; SHEPPARD, H. G. Twelve generations of marginal protein deficiency. **British Journal of Nutrition**, v. 33, p. 233-253, 1975.
- STONE, N. E.; LEWS, J. K.; WHISLER, K. E.; BROWN, D. J. Incorporation of carbon from glucose into cerebral aminoacids proteins and lipids, and alterations during recovery from hypoglycemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 19, p. 321-332, 1972.

SUGITA, N. Comparative Studies on the growth of the cerebral cortex. VII. On the influence of starvation at an early age upon the development of the cerebral cortex: albino rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 29, p. 177-240, 1918.

TATLI, M.; GUZEL, A.; KIZIL, G.; KAVAK, V.; YAVUZ, M.; KIZIL, M. Comparison of the effects on redox state of central nervous system in offspring rats. **Brain Research**, v. 1156, p. 21-30, 2007.

TEODÓSIO, N. R.; LAGO, E. S.; ROMANI, S. A.; GUEDES, R. C. A. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 40, n. 4, p. 533-547, 1990.

TERMINOLOGIA ANATÔMICA. SBA – Sociedade Brasileira de Anatomia. Manole: SP, 2001, 248 p.

TERRY, R. D.; DETERESA, R.; HANSEN, L. A. Neocortical cell counts in normal human adult aging. **Annales of Neurology**, v. 21, p. 530-539, 1987.

TESTUT, L.; LATARJET, A. Estructura general de la corteza cerebral, p.973. In: **Tratato de Anatomía Humana**. 8. ed. Barcelona, Buenos Aires: Editora Salvat, 1945. tomo 2, 1275p.

THOMAS, E. and PEARSE, A. G. E. The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. **Histochemie**, v. 2, p. 266-282, 1961.

THOMAS, E. and PEARSE, A. G. E. The solitary active cells. Histochemical demonstration of damage resistant nerve cells with a TPN diaphorase reaction. **Acta Neuropathologica**, v. 3, p. 238-249, 1964.

THOMPSON, E. Quantitative microscopy analysis. **Journal of Geology**, v. 38, p. 193, 1930.

TONKISS, J.; GALLER, J. R. Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. **Behavioural Brain Research**; v. 40, n. 2, p. 95-107, 1990.

TONKISS, J.; GALLER, J.; MORGANE, P.; BRONZINO, J. D.; AUSTIN-LAFRANCE, R. J. Prenatal Protein Malnutrition and Postnatal Brain Function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 678, p. 215-227, 1993.

VALTSCHANOFF, J.G., WEINBERG, R.J., KHARAZIA, V.N., SCHMIDT, H.H.H.W., NAKANE, M. and RUSTIONI, A. Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide:

NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry and colocalization with GABA. **Neuroscience Letters**, v. 157, p. 157-161, 1993.

VARGAS, V.; VARGAS, R.; MATEU, L.; LUZZATI, V. The effects of undernutrition on the physical organization of rat sciatic myelin sheaths: an X-ray scattering study. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 817, p. 368-371, 1997.

VIAU, V.; BINGHAM, B.; DAVIS, J.; LEE, P.; WONG, M. Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. **Endocrinology**, v. 146, p. 137-146, 2005.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, p. 755-784, 1992.

VINCENT, M.; RADERMECKER, M. A. Histologic investigation of muscle tissue in Kwashiorkor. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 8, n.4, p. 511-517, 1959.

WALLINGFORD, J. C.; SHRADER, R. E.; ZEMAN, F. J. Effect of maternal protein-calorie malnutrition on fetal rat cerebellar neurogenesis. **The Journal of Nutrition.**, v. 110, p. 543-551, 1980.

WANG, L.; XU, R. J. The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behavioral and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, p. 467-472, 2007. Supplement 1.

WERNETTE, C. M.; WHITE, B. D.; ZIZZA, C. A. Signaling proteins that influence energy intake may affect unintentional weight loss in elderly persons. **Journal of American Diet Association**, v. 111, p. 864-873, 2011.

WEST, C. D.; KEMPER, T. L. The effects of a low protein diet on the anatomical development of the rat brain. **Brain Research**, v. 107, p. 221-237, 1976.

WFP. WORLD FOOD PROGRAMME. **Hunger map**, 2011. Disponível em: <
<http://www.wfp.org/students-and-teachers/teachers/blog/new-teaching-tool-hunger-map-2011>
>. Acesso em: 10 nov. 2012.

WFP. WORLD FOOD PROGRAMME. **Hunger map**, 2012. Disponível em: <
<http://www.wfp.org/hunger/map> > Acesso em: 10 nov. 2012

WHITTEN, W. K. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. **The Journal of Endocrinology**, v. 13, p. 399-404, 1956.

WIGGLESWORTH, J. S. Experimental growth retardation in foetus rat. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 88, p. 1-13, 1964.

WIGGINS, R. C. Myelin development and nutritional insufficiency. **Brain Research Reviews**, v. 2, n. 4, p. 151-175, 1982.

WIGGINS, R. C.; MILLER, S. L.; BENJAMINS, J. A.; KRIGMAN, M. R.; MORELLI, P. Myelin synthesis during postnatal nutritional deprivation and subsequent rehabilitation. **Brain Research**, v. 107, n. 2, p. 257-273, 1976.

WIGGINS, R. C.; FULLER, G. N.; BRIZEE, L.; BISSEL, A. C.; SAMORAJSKI, T. Myelination of the rat optic nerve during postnatal undernourishment and recovery: a morphometric analysis. **Brain Research**, v. 308, n. 2, p. 263-272, 1984.

WILLIAMS, P. L.; WARWICK, R.; DYSON, M.; BANNISTER, L. H. **Gray anatomia**. 37. ed. London: Churchill Livingstone, 1995. 1489 p.

WINICK, M. Malnutrition and brain development. **The Journal of Pediatrics**, v. 74, n. 5, p. 667-679, 1969.

WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **The Journal of Nutrition**, v. 89, n. 3, p. 300-306, 1966.

WINICK, M.; NOBLE, A. Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. **Developmental Biology**, v. 12, p. 451-466, 1965.

WINICK, M.; ROSSO, P. Head circumference and intellectual growth of the brain in normal and marasmic children. **The Journal of Pediatrics**, v. 74, p. 774-778, 1969a.

WINICK, M.; ROSSO, P. The effects of severe early malnutrition on cellular growth of the human brain. **Pediatric Research**, v. 3, p. 181-184, 1969b.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bull World Health Organ**, v. 75, n. 1, p. 81-93, 1997.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health Report. Make every mother and child count**, v.75, n. 1, p. 81-93, 2005.

YAMANO, T.; SHIMADA, M.; YAMASAKI, S.; GOTO, M.; OHOYA, N. Effect of maternal protein malnutrition on the developing of cerebral cortex of mouse embryo: an electron microscopic study. **Experimental Neurology**, v. 68, p. 228-239, 1980.

YAN, X. X., GAREY, L. J.; JEN, L. S. Development of NADPH-diaphorase activity in rat neocortex. **Developmental Brain Research**, v. 79, p. 29-38, 1994.

ZAMENHOF, S.; VAN MARTHENS, E.; GRAUEL, L. Prenatal cerebral development: effect of restricted diet, reversal by growth hormone. **Science**, v. 174, p. 954-955, 1971.

ZAMENHOF, S.; van MARTHENS, E.; GRAUEL, L. DNA (cell number) and protein in rat brain. Second generation (F2) alteration by maternal (F0) dietary protein restriction, **Nutr. Metab.**, 14: 262-270, 1972.

ZAMENHOF, S.; HALL, S. M.; GRAUEL, L.; VAN MARTHENS, E. Deprivation of amino acids and prenatal brain development in rats. **The Journal of Nutrition**, v.104, p. 1002-1007, 1974.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1984. 718 p.

ANEXOS

Fonte: Apostila do 2nd ISS Brazilian Stereology Course, São Paulo, Brazil, July 30th – August 3rd, 2007.

ANEXO B – Sistema teste utilizado paras as quantificações

25 x 19 =
475

Fonte: Laboratório de Anatomia funcional aplicado à clínica e à cirurgia - LAFACC (ICB/USP)

ANEXO C – Sistema teste contendo linhas de inclusão (linhas pontilhadas) e exclusão (linhas cheias), utilizado para as quantificações.