

GUSTAVO HENRIQUE DE SOUZA E REZENDE

**NEUROPLASTICIDADE INDUZIDA PELO *STATUS*
EPILEPTICUS EM RATOS NORMONUTRIDOS E
DESNUTRIDOS**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2006**

GUSTAVO HENRIQUE DE SOUZA E REZENDE

**NEUROPLASTICIDADE INDUZIDA PELO *STATUS*
EPILEPTICUS EM RATOS NORMONUTRIDOS E
DESNUTRIDOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2006**

ORIENTADO:

Gustavo Henrique de Souza e Rezende

ORIENTADOR:

Tasso Moraes e Santos

CO-ORIENTADOR:

Márcio Flávio Dutra Moraes

INSTITUIÇÃO PARTICIPANTE:

Faculdade de Farmácia da UFMG

LINHA DE PESQUISA:

Nutrição, Alimentação e Saúde.

ÁREA DE CONHECIMENTO

2.10.07.00-4 – Toxicologia

4.05.01.00-0 – Bioquímica da Nutrição

4.05.00.00-4 – Nutrição

4.05.04.00-0 – Desnutrição e desenvolvimento fisiológico

Dedico este trabalho à minha amada esposa, Grace, ao meu querido filho, Carlos Eduardo, que são a razão da minha vida e aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar nesta vida.

À minha esposa, Grace Kelly Petrarca e Rezende, pelo amor, carinho, dedicação, companheirismo e compreensão em todos os momentos.

Ao meu filho Carlos Eduardo, pelo amor, carinho e amizade.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo.

Ao Professor Tasso Moraes e Santos, pelo exemplo de ser humano e filosofia de vida, pelos princípios e exemplo de pesquisador, pelos ensinamentos, orientação e oportunidades oferecidas e acima de tudo pela amizade.

Ao Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes, exemplo de pesquisador, co-orientação, incentivo durante todo trabalho e principalmente pela amizade.

Ao amigo e Prof. Dr. André Ricardo Massensini, pela ajuda, e colaboração durante o trabalho realizado.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Experimental, Renata Viana Abreu, Alexandre, Gleicimara, Maria das Graças Vilela Torquato, Nívea, Vinícius, Wagner, Eliane, Marclênia, Silmara, Janaína, Renata, Ricardo, pela colaboração durante a realização deste trabalho e convívio sempre agradável.

Aos amigos do NNC – Núcleo de Neurociências, (Professora Dr^a Maria Carolina Doretto, Elvano, Vinícius, Leonardo, Fumega, Túlio, Thiago, Patrícia, Luciana, Gabriel, Gioconda, Maura, Fernanda Caldeira, Fernanda Sada, Aline, Guilherme, entre outros), pela amizade, colaboração e convívio sempre agradável.

À família de meus orientadores, pela compreensão, dedicação e amizade, em especial à Maria.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pelo conhecimento transmitido.

À Maria Beatriz Abreu Glória, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

À veterinária Maria Adelaide Fernandes responsável pelo biotério da Faculdade de Farmácia e ao José Batista Viturino, funcionário do biotério, pela disponibilidade e auxílio na manutenção dos animais utilizados.

Aos órgãos institucionais financiadores FAPEMIG, CAPES, CNPq e PRPQ-UFMG.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | 8 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | 9 |
| RESUMO..... | 10 |
| ABSTRACT..... | 12 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 17 |
| 2.2 Desnutrição e Sistema Nervoso Central..... | 18 |
| 2.7 Neuroplasticidade, Aprendizado e Desnutrição..... | 21 |
| 2.3 As Epilepsias..... | 23 |
| 2.4 Epilepsia de lobo temporal..... | 25 |
| 2.5 Modelo de Crises Recorrentes Espontâneas Provocadas por Injeção Sistêmica de Pilocarpina..... | 26 |
| 2.1 Sinapse e o Sistema Glutamatérgico..... | 27 |
| 2.6 Vídeo-Eletroencefalografia..... | 31 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 32 |
| 3.1 Modelo Experimental..... | 33 |
| 3.2 Material..... | 35 |
| 3.2.1 Reagentes..... | 35 |
| 3.2.2 Equipamentos..... | 35 |
| 3.3 Métodos..... | 36 |
| 3.3.1 Confeção dos Eletrodos..... | 36 |
| 3.3.2 Cirurgia para Implante de Eletrodos com Capacete..... | 36 |
| 3.3.3 Cuidados Pós-Operatórios..... | 38 |
| 3.3.4 Procedimento de Registro de Vídeo-EEG..... | 38 |
| 3.3.5 Perfusão e Histologia..... | 39 |
| 3.3.6 Marcação de Neo-Timm..... | 40 |
| 3.3.7 Procedimento para Registro das Imagens..... | 43 |
| 3.3.8 Determinação de Glutamato Liberado..... | 43 |
| 3.3.9 Determinação de Proteína..... | 44 |
| 3.3.10 Determinação de DNA..... | 44 |
| 3.3.11 Análise Estatística dos Dados..... | 45 |
| 4 RESULTADOS | 46 |
| 4.1 Efeito da Restrição de Alimentos sobre a Massa Corporal dos Animais..... | 47 |
| 4.2 Efeito da Restrição de Alimentos sobre a Massa do Encéfalo..... | 48 |
| 4.3 Efeito da Restrição de Alimentos sobre a Massa do Hipocampo..... | 49 |
| 4.4 Análise Densitométrica do Brotamento Axonal..... | 51 |
| 4.5 Efeito da Restrição de Alimentos sobre o Conteúdo de Proteína e DNA no Hipocampo..... | 52 |
| 4.6 Liberação de Glutamato Estimulada por k^+ | 54 |
| 4.7 Latência para o Início das Crises Recorrentes Espontâneas..... | 55 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.8 | Número de Crises Recorrentes Espontâneas Durante um Período de 6 Horas por Dia..... | 56 |
| 4.9 | Tempo Médio de Duração das Crises Recorrentes Espontâneas..... | 57 |
| 4.10 | Tempo Médio de Duração de Registro-EEG Epileptiforme Durante as Crises Recorrentes Espontâneas..... | 58 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 61 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 65 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 67 |
| 8 | ANEXO..... | 78 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Etapas do procedimento de implantação dos eletrodos superficial e profundo. | 37 |
| 2 | Equipamentos de registro de vídeo-EEG. | 39 |
| 3 | Foto ilustrativa da cirurgia para realizar a perfusão do rato, como parte do protocolo realizado para marcação histoquímica pelo Neo-Timm. | 41 |
| 4 | Efeito da restrição de alimentos sobre a massa corporal dos ratos. | 47 |
| 5 | Efeito da restrição de alimentos sobre o peso encefálico dos ratos. | 48 |
| 6 | Efeito da restrição de alimentos sobre o peso do hipocampo dos ratos. | 49 |
| 7 | Marcação histoquímica pelo Neo-Timm | 50 |
| 8 | Análise densitométrica do brotamento axonal. | 51 |
| 9 | Conteúdo de proteínas do hipocampo dos animais. | 52 |
| 10 | Conteúdo de DNA do hipocampo dos animais. | 53 |
| 11 | Liberação de glutamato estimulada por K^+ em fatias de hipocampo. | 54 |
| 12 | Latência para o início das crises recorrentes espontâneas. | 55 |
| 13 | Número de crises recorrentes espontâneas em um período de registro de 6 horas por dia. | 56 |
| 14 | Tempo médio de duração das crises recorrentes espontâneas dos animais | 57 |
| 15 | Tempo médio de duração de registro-EEG epileptiforme durante as crises espontâneas recorrentes. | 58 |
| 16 | Registro eletroencefalográfico típico encontrado durante uma crise recorrente espontânea. | 59 |
| 17 | Segmentos do eletroencefalograma representado na figura 16, em escala amplificada, nos períodos correspondentes a uma crise típica nas diferentes regiões do cérebro. | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| Ca ²⁺ | Íon cálcio |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| EEG | Eletroencefalografia |
| EMT | Esclerose Mesial Temporal |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GNP | Grupo de animais normonutridos induzidos ao <i>status epilepticus</i> pela pilocarpina |
| GN | Grupo de animais normonutridos sem indução ao <i>status epilepticus</i> pela pilocarpina |
| GDP | Grupo de animais desnutridos induzidos ao <i>status epilepticus</i> pela pilocarpina |
| GD | Grupo de animais desnutridos sem indução ao <i>status epilepticus</i> pela pilocarpina |
| GDH | Glutamato desidrogenase |
| Glu | Glutamato |
| GluRs | Receptores glutamatérgicos |
| iGluRs | Receptores glutamatérgicos ionotrópicos |
| i.p | Intraperitoneal |
| KCl | Cloreto de potássio |
| KHz | Quilo Hertz |
| mGluRs | Receptores glutamatérgicos metabotrópicos |
| mM | Milimolar |
| μ m | Micrômetro |
| NMDA | N-methyl-D-Aspartate |
| Na ⁺ | Íon sódio |
| PILO | Cloridrato de pilocarpina |
| SE | <i>Status Epilepticus</i> |
| SNC | Sistema nervoso central |

RESUMO

A desnutrição neonatal exerce significativo efeito sobre a morfologia e fisiologia do sistema nervoso central em desenvolvimento, conduzindo, freqüentemente, a alterações permanentes. Esses efeitos são altamente danosos quando ocorrem em períodos de neurogênese, inclusive no brotamento axonal. Para investigar o efeito da desnutrição neonatal sobre a neuroplasticidade no Sistema Nervoso Central, induzida pelo *status epilepticus*, provocado pela pilocarpina, foram utilizados quatro grupos de ratos Wistar. Grupo normonutrido (GN), alimentado *ad libitum* com ração de biotério suplementada com 25% de ração para cães; Grupo desnutrido (GD), alimentado com 60% da quantidade de dieta ingerida pelo grupo GN. Os grupos, normonutrido e desnutrido, foram subdivididos: Um grupo (GNP) e um desnutrido (GDP), aos 45 dias de idade os animais foram submetidos ao *status epilepticus* induzido pela pilocarpina (320 mg/kg ip), 30 minutos após a administração de metil-escopolamina (1,0 mg/kg i.p.). Após um período de noventa minutos em *status epilepticus*, a crise foi abortada com Diazepam NQ[?] (20mg/kg). O controle do grupo normonutrido (GN) e desnutrido (GD) teve o mesmo tratamento, com injeção de salina ao invés de pilocarpina. Após um período de recuperação os animais foram filmados diariamente por um período de 6 horas. Aos 120 dias de vida dados eletroencefalográficos foram registrados e então os ratos foram sacrificados para determinação de DNA, proteínas, liberação de glutamato do hipocampo e coloração por Neo-Timm do brotamento de células granulares do hipocampo. Não se observou diferença na latência do aparecimento de crises recorrentes espontâneas (CRE) e na quantidade diária de crises entre os grupos GNP e GDP. No entanto, observou-se maior tempo de duração das CRE no grupo GNP quando comparado ao GDP, mas essa diferença não foi observada quando comparado o tempo de registro-EEG epileptiforme nestes grupos. Os grupos GN e GD não apresentaram CRE. O modelo de restrição alimentar utilizado promoveu diminuição da massa corporal a partir do 7^o dia de vida e da massa do cérebro, avaliada no sacrifício. Não foram encontradas diferenças nas quantidades de proteínas e DNA nas amostras de tecidos hipocampais nos grupos normonutridos e desnutridos, controles ou tratados com pilocarpina. A quantidade de glutamato (GLU) liberado, estimulada por K⁺, foi maior em fatias de hipocampo do grupo GNP, em relação aos demais grupos. Da mesma maneira foi encontrada maior intensidade de brotamento das fibras musgosas das células granulares do hipocampo no grupo GNP em relação ao grupo GDP,

avaliado pelo Neo-Timm. Os grupos GN e GD não apresentaram brotamento axonal. Tais achados indicam uma neuroplasticidade diminuída pelo insulto nutricional no modelo de epilepsia promovido por injeção sistêmica de pilocarpina.

Palavras chaves: Desnutrição, neuroplasticidade, brotamento axonal e epilepsia.

ABSTRACT

Neonatal undernutrition plays a significant role on morphology and physiology of the developing central nervous system (CNS), leading, frequently, to permanent alterations. These alterations are highly injurious when occur in the period of neurogenesis, including axonal sprouting. To investigate the effect of neonatal undernutrition on neuroplasticity of the CNS, promoted by the *status epilepticus* provoked by pilocarpine, four groups of Wistar rats were used. Wellnourished group (WNG) fed *ad libitum* lab chow diet supplemented with 25% dog food; Undernourished group fed 60% of the amount of diet consumed by WNG; The wellnourished and undernourished groups were subdivided: one wellnourished group (WNGP) and one undernourished group (UNGP), at 45 days of life, were submitted to *status epilepticus* by pilocarpine induction (320 mg/kg i.p.) 30 minutes after the administration of methyl-scopolamine (1,0 mg/kg i.p.). After 90 minutes in *status epilepticus*, the seizures were aborted with Diazepam NQ™ (20 mg/kg). The control groups (WNG and UNG) had the same treatment, but saline injection replaced pilocarpine. After a recovery period, the animals were filmed daily for a period of 6 hours. At 120 days of life electroencephalography was registered and then the rats were sacrificed to measure DNA, proteins, glutamate release from hippocampus and Neo-Timm staining of the hippocampus granule cells sprouting. No difference was observed in the latency of the beginning of the spontaneous recurrent seizures (SRS), neither in the daily quantity of seizures between the WNGP and UNGP. However, it was observed longer lasting time of the SRS in the WNGP when compared to UNGP, but this difference was not observed for epileptiform EEG-register in this groups. The WNG and UNG did not present SRS. The food restriction model used decreased body mass from 7th day of life and brain mass at the sacrifice. No differences were found in the amount of proteins and DNA content in samples from hippocampus tissues of WNG and UNG controls or pilocarpine-treated. The amount of glutamate released, stimulated by K⁺, was greater in the hippocampus slices of WNGP than in others studied groups. Also, it was found higher intensity of the mossy fibers sprouting of the granule cells of the hippocampus in WNGP than in the UNGP, assessed by Neo-Timm. The WNG and UNG groups did not present sprouting. The results indicate decreased neuroplasticity, due to nutritional insult, in the epilepsy model promoted by systemic injection of pilocarpine.

Key words: Under-nutrition, neuroplasticity, sprouting and epilepsy.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição é um problema mundial que afeta milhões de crianças durante os estágios vulneráveis de desenvolvimento do sistema nervoso central. Eventos de maturação cerebral podem resultar em alterações comportamentais, anormalidades na função cognitiva e distúrbios de aprendizado e memória. Os três fatores, genético, estimulação ambiental e nutrição adequada são necessários para a maturação e desenvolvimento do sistema nervoso central (MORGANE *et al.* 2002).

As sinapses são formadas por mecanismos bem complexos e que ocorrem durante o desenvolvimento pré-natal até a vida adulta. Um dos fatores epigenéticos que regula o número de sinapses no cérebro em desenvolvimento é a quantidade apropriada de nutrientes. Quando em quantidades insuficientes, causa efeitos danosos na formação da sinapse (DYSON & JONES, 1976; BEDI *et al.*, 1980; KAWAI *et al.*, 1989, GRANADOS-ROJAS *et al.*, 2002) e na mielinização no cérebro (KAWAI *et al.*, 1989). Há evidências de que a disfunção cerebral causada pela desnutrição pode, em parte, ser irreversível. Achados eletro-encefalográficos (EEG) anormais foram associados à desnutrição (MOUREK *et al.*, 1967).

A desnutrição neonatal afeta a ramificação dendrítica, crescimento axonal, número de espículas neurais e formação de sinapses durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, estando todos estes processos diretamente relacionados a biossíntese de proteínas. Durante o período de rápido crescimento do cérebro, a taxa de biossíntese de proteínas está aumentada em cinco vezes quando esta é comparada com animais adultos (LAJTHA *et al.*, 1979). No entanto, a biossíntese de proteínas pode ser bloqueada pela desnutrição, conforme estudos prévios do nosso laboratório, em animais experimentais submetidos à restrição de alimentos, onde foi encontrada uma menor taxa de biossíntese de proteínas no grupo de animais desnutridos, em estudos “*in vitro*” (MORAES-SANTOS, 1981), “*ex vivo*” (SANTOS & MORAES-SANTOS, 1979), e estudos “*in vivo*” (PEDROSA & MORAES-SANTOS, 1987).

Uma das estruturas cerebrais particularmente afetada por esse tipo de insulto é o hipocampo no qual ocorre uma significativa neurogênese no período pós-natal (BAYER & ALTMAN, 1974).

O hipocampo possui importantes circuitos glutamatérgicos, sendo o glutamato o neurotransmissor excitatório predominante do sistema nervoso de mamíferos, agindo em vários receptores (BUGGY *et al.*, 2000), estando diretamente relacionado ao aprendizado e memória (IZQUIERDO & MEDINA, 1997), aos processos plásticos no

cérebro (OZAWA *et al.*, 1998), à transdução central e à fisiopatologia da morte neuronal após injúria cerebral (BUGGY *et al.*, 2000), proliferação e migração celular (MCDONALD & JOHNSTON, 1990). A neurotransmissão glutamatérgica também desempenha papel crucial no desenvolvimento e manutenção de crises convulsivas, as quais estão presentes no fenômeno epiléptico. Além disso, pronunciada liberação de glutamato, seguida da ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), kainato assim como os receptores metabotrópicos vêm sendo associados a excito-toxicidade provocada pelo glutamato e morte neuronal em várias estruturas durante o *status epilepticus* (SE) (MILLAN *et al.*, 1993).

Neuroplasticidade congrega diversos processos de vital importância pelos quais o cérebro percebe, se adapta e responde à variedade de estímulos internos e externos. No entanto, nem toda neuroplasticidade é benéfica, pois pode gerar comportamentos disfuncionais constituindo alterações psicológicas ou até quadros fisiopatológicos (KANDEL & SCHWARTZ, 1991). As manifestações da neuroplasticidade no sistema nervoso central adulto são caracterizadas como alterações na função dendrítica, reestruturação sináptica, brotamento axonal, extensão do neurônio, sinaptogêneses e neurogêneses (MESULAM, 1999). A plasticidade exerce um importante papel em resposta às injúrias. Análise histológica de fragmentos de lobo temporal em humanos, ou em animais experimentais induzidos por modelo de epilepsia de lobo temporal, revelou alterações patológicas no hipocampo (REPRESA *et al.*, 1995), região envolvida na cognição, sendo tais alterações responsáveis por prejuízos em processos cognitivos (SUTULA *et al.*, 1994).

Alterações eletroencefalográficas e comportamentais, provocadas por desnutrição protéica pré-natal, com atraso no aparecimento de respostas características ao fenômeno e correlacionadas ao abrasamento por estímulo elétrico no hipocampo, evidenciam plasticidade neural diminuída (BRONZINO *et al.*, 1986).

Um dos mais estudados modelos de epilepsia de lobo temporal, no qual a injeção sistêmica de pilocarpina, um agonista muscarínico colinérgico, promove o *status epilepticus* (SE), e após um período latente de duas a três semanas em média, promove o aparecimento de crises recorrentes espontâneas em ratos, assim como o brotamento das fibras musgosas das células granulares do hipocampo. Estes dois eventos, decorrentes de uma resposta do SNC do rato, frente a um insulto (SE provocado pela pilocarpina), já estão bem caracterizados na literatura, tornando-se um excelente modelo para se estudar neuroplasticidade.

O brotamento das fibras musgosas das células granulares é um achado, tanto em esclerose mesial temporal (EMT) em humanos (SLOVITER, 1994), como em vários modelos animais de epilepsia de lobo temporal (MELLO *et al.*, 1993). O dano cerebral induzido pelo SE provocado pela pilocarpina pode ser considerado equivalente a episódios de convulsões febris prolongadas ou SE na infância, o qual é frequentemente comum em pacientes com EMT, que segundo SLOVITER (1994), tal lesão poderia ser crucial para o aparecimento das crises em pacientes com epilepsia de lobo temporal.

O brotamento das fibras musgosas das células granulares envolve a formação de um novo e assimétrico contato sináptico entre o terminal das fibras musgosas e dendritos das células granulares piramidais e interneurônios inibitórios da camada molecular interna. No entanto, o mecanismo e conseqüências funcionais do brotamento das fibras musgosas evoluindo para crises recorrentes espontâneas permanecem por ser definidos. Estudos eletrofisiológicos do brotamento das fibras musgosas na camada molecular interna indicam que esta reorganização sináptica resulta em um circuito recorrente excitatório e subseqüente hiper-excitabilidade hipocampal (TAUCK & NADLER, 1985). Por outro lado, estudos recentes indicam a perda das células no hilo do giro denteado, mais que outras conseqüências plásticas provocadas pelo SE, como o brotamento das fibras musgosas, é responsável pela hiper-excitabilidade do hipocampo (ZAPPONE & SLOVITER, 2004).

A plasticidade é uma propriedade do Sistema Nervoso Central em resposta a um estímulo, podendo esta propriedade ser funcional ou não. A desnutrição neonatal dificulta esta resposta fisiológica, impedindo processos de aprendizado e memória, assim como respostas a injúrias. Nosso presente estudo indica que o brotamento das fibras musgosas das células granulares provocados pelo SE induzido pela pilocarpina, assim como o aumento na liberação de glutamato estimulada por K^+ no grupo de animais que sofreram SE, foram inibidos pela desnutrição neonatal, provavelmente relacionada à diminuição da síntese de proteínas provocada pela mesma, a qual inibiu a plasticidade do SNC em resposta ao SE. No entanto, não foram observadas alterações significativas em relação às crises recorrentes espontâneas (CRE). Tais achados indicam que o brotamento das fibras musgosas das células granulares não é a causa das CRE.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – DESNUTRIÇÃO E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A desnutrição é um problema mundial principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Aproximadamente 195 milhões de crianças menores de cinco anos apresentam algum grau de desnutrição. A desnutrição pode trazer vários problemas de saúde que se expressam pela perda de peso, baixa estatura, baixa resistência às infecções, podendo levar até a morte. Principalmente por volta dos dois anos de vida, a desnutrição pode acarretar as mais severas seqüelas, fase na qual há um crescimento acelerado do corpo e onde o cérebro cresce aproximadamente 80% do seu tamanho adulto; fase na qual também há uma maior necessidade de nutrientes. A privação alimentar nesta fase pode prejudicar o desenvolvimento mental e conseqüentemente intelectual pela produção de um dano estrutural irreversível no cérebro (BROWN & POLLITT, 1996).

Um fator agravante associado aos efeitos de longa duração ou até mesmo permanentes é que vários dispositivos e práticas comportamentais, associados com a desnutrição, tendem a ser transmitidos de geração a geração. Estes efeitos se tornam perpetuados, e mesmo cumulativos sobre várias gerações, demonstrando que a reabilitação educacional, econômica, comportamental e nutricional é necessária por mais de uma geração para reparar os efeitos residuais da desnutrição (MORGANE *et al*, 2002).

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

A desnutrição, principalmente no período inicial de vida quando ocorre o período crítico de crescimento e desenvolvimento, causa efeitos irreversíveis (DOBBING & SANDS, 1979). A reabilitação nutricional posterior não é capaz de reverter o dano na formação do sistema nervoso central (SNC) e na síntese e liberação de neurotransmissores (GONÇALVES, 2001).

O crescimento dos tecidos, incluindo o cérebro, é resultado da divisão e do aumento no tamanho das células (WINICK & NOBLE, 1965). O desenvolvimento normal de um órgão pode ser dividido em três fases distintas. Na primeira fase, há uma rápida divisão celular sem o aumento do tamanho das células, denominado de multiplicação celular ou hiperplasia, que pode ser avaliada pelo conteúdo de DNA. Na segunda fase, a síntese de DNA (número de células) continua em menor proporção com significativo aumento no tamanho celular; este período é denominado de hipertrofia com acréscimo no conteúdo de proteínas (WINICK & NOBLE, 1965; MORGAN & WINICK, 1985).

Geralmente, embora o crescimento encefálico seja menos afetado do que o restante do corpo pela desnutrição, até mesmo uma pequena diminuição nos níveis ótimos de um simples nutriente durante o período crítico de crescimento cerebral pode significar um atraso no crescimento e na mitose celular. Nem mesmo a reabilitação nutricional alcançaria o crescimento normal (MORGAN & WINICK, 1985).

A desnutrição neonatal afeta a ramificação dendrítica, crescimento axonal, número de espículas neurais e formação de sinapses durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, estando todos estes processos diretamente relacionados à biossíntese de proteínas. Sob condições normais de alimentação, o período de amamentação é caracterizado pelos altos níveis de síntese protéica. O desenvolvimento dendrítico está associado com altas proporções de síntese protéica no corpo do neurônio, e a desnutrição, por sua vez, pode causar possíveis danos no desenvolvimento dos dendritos e na formação das sinapses durante o período de desenvolvimento rápido do cérebro (MORGAN & WINICK, 1985).

Durante o período de rápido crescimento do cérebro, a taxa de biossíntese de proteínas está aumentada em cinco vezes quando esta é comparada com animais adultos (LAJTHA *et al.*, 1979). No entanto, a biossíntese de proteínas pode ser bloqueada pela desnutrição, conforme estudos prévios do nosso laboratório em animais experimentais submetidos à restrição de alimentos, onde foi encontrada uma menor taxa de biossíntese de proteínas no grupo de animais desnutridos, em estudos “in vitro” (MORAES-SANTOS, 1981), “ex vivo” (SANTOS & MORAES-SANTOS, 1979), e estudos “in vivo” (PEDROSA & MORAES-SANTOS, 1987).

Nos animais subnutridos, o córtex cerebral tem mais de 40% de perda das sinapses (MORGAN & WINICK, 1985), o que explicaria o prejuízo na transmissão de informações (DYSON & JONES, 1976), uma vez que a quantidade de neurotransmissores estaria diminuída. Essas alterações, acontecidas em decorrência

da restrição alimentar precoce de ratos, não podem ser revertidas inteiramente pela reabilitação nutricional, deixando seqüelas permanentes (PEDROSA & MORAES-SANTOS, 1987).

Períodos moderados a severos de desnutrição, antes dos dois primeiros anos de vida em humanos, são associados a retardos no desenvolvimento cognitivo e ao desempenho escolar em crianças (HALL *et al.*, 2001; GALLER & ROSS, 1993; citado por FIACCO *et al.*, 2003).

Modelos de desnutrição animal durante o período pré-natal levam à alteração do desenvolvimento pós-natal do cérebro apesar da reabilitação nutricional ao nascimento. Alterações no comportamento, anatomia, química e fisiologia estendem-se após o período pós-natal, permanecendo até a vida adulta (FIACCO *et al.*, 2003).

A maturação cerebral envolve uma série de estágios sobrepostos temporalmente e que seguem uma precisa seqüência que difere de região para região cerebral e mesmo dentro de uma região em particular, variando temporalmente de uma espécie para outra (MORGANE *et al.* 2002).

O conceito relativo ao impacto da injúria precoce ao cérebro está baseado na concepção de que há períodos do desenvolvimento durante os quais o organismo é particularmente vulnerável. Este, denominado período crítico, representa um único período restrito de desenvolvimento que não pode ser revertido ou repetido posteriormente. Durante o período de rápido crescimento cerebral (período no qual processos organizacionais estão sendo modificados mais rapidamente), cada sub-região do cérebro segue uma cuidadosa e intrincada programação seqüencial de desenvolvimento, a qual deve ser sincronizada temporalmente com outras regiões interligadas, de tal forma que o produto final seja intacto e apto na estrutura madura. O desenvolvimento normal também depende da formação e diferenciação de células neurais, ocorrendo de forma inter-relacionada. Uma das maiores incumbências no cérebro em desenvolvimento é estabelecer padrões corretos de conexões em um determinado período de tempo (MORGANE *et al.* 2002). Distorções na maturação coordenada de diferentes componentes cerebrais poderão romper o crescimento ordenado e elaboração do circuito neural (KAWAGUCHI & HAMA, 1988; citado por MORGANE *et al.*, 2002). Atraso em apenas poucos eventos neurológicos isolados resultantes da desnutrição pode causar reações em cadeia amplificando erros funcionais. Interferências temporais na progressão de processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de desenvolvimento do SNC, podem levar ao déficit funcional permanente (MORGANE *et al.* 2002).

Dependendo do grau da injúria nutricional, período e tempo de imposição (MORGANE *et al.* 2002) e de eventual posterior reabilitação nutricional (GRESSENS *et al.*, 1997), nem alterações anatômicas ou patologias focais equivalentes a lesões microscópicas, nem mesmo retardo mental expressivo ou psicopatologias são detectáveis. No entanto, poderão resultar em condições sub-otimizadas permanentes do desenvolvimento intelectual e comportamental. Desequilíbrio no sistema de neurotransmissores, por exemplo, mais do que lesões focais aparentes contribuem significativamente para alterações funcionais tardias (MORGANE *et al.* 2002).

Déficits de desenvolvimento resultantes da desnutrição não levam necessariamente às disfunções cerebrais imediatas. A maior parte dos fenômenos biológicos opera com um nível de substratos além aquele necessário para encontrar a velocidade máxima ou manter as condições de equilíbrio. Portanto, as conseqüências de uma limitação anormal durante um período específico do desenvolvimento cerebral podem permanecer subliminarmente, ou podem apenas manifestar-se como uma predisposição, até que o sistema passe por situações de estresse emocional ou ambiental não usual.

Como conseqüência da desnutrição em um período crítico, pode permanecer uma limitada plasticidade no sistema. No entanto, essa plasticidade residual permite que a reabilitação nutricional associada a outros fatores ambientais, exerça algum efeito de melhora após a injúria nutricional (MORGANE *et al.* 2002).

2.2 – NEUROPLASTICIDADE, APRENDIZADO E DESNUTRIÇÃO

Neuroplasticidade congrega diversos processos de vital importância pelos quais o cérebro percebe, se adapta e responde à variedade de estímulos internos e externos. As manifestações da neuroplasticidade no sistema nervoso central adulto são caracterizadas como alterações na função dendrítica, reestruturação sináptica, brotamento axonal, extensão do neurônio, sinaptogêneses e neurogêneses (MESULAM, 1999).

O aprendizado é o processo pelo qual obtemos conhecimento do mundo, enquanto que a memória é o processo pelo qual este conhecimento é estocado e mais tarde recuperado (KANDEL & SCHWARTZ, 1991). A memória apresenta duas etapas: memória em curto prazo e memória em longo prazo. A primeira persiste por curto período de tempo e está relacionada às alterações funcionais do sistema nervoso central (SNC). Este tipo de memória pode se converter na segunda etapa, memória em

longo prazo, com uma estocagem permanente da informação, caso ocorram alterações não somente funcionais como também estruturais do SNC (WANG *et al.*, 1997).

A suposição de que a informação é estocada no cérebro quando há alterações na eficiência sináptica foi proposta por Ramon y Cajal no início do século XIX (MILNER *et al.*, 1998). A ligação sináptica entre duas células é fortalecida se essas células forem ativadas ao mesmo tempo. “Quando o axônio da célula A é próximo o suficiente para excitar a célula B repetidamente, algum processo de crescimento ou alterações metabólicas acontecem em uma ou ambas as células, como se aumentasse a eficiência da célula A em estimular a célula B” (HEBB, 1949). Um aumento na eficiência sináptica, que perdurava por dias em neurônios hipocampais, foi demonstrado por (KANDEL *et al.*, 1991; MILNER *et al.*, 1998) em um experimento em que estimulação de alta frequência (100 Hz durante 1 segundo), aplicado à via perfurante, produz um aumento do potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) no giro denteado. Este aumento na potenciação sináptica se mantém por horas, dias ou mesmo semanas e foi mais tarde chamado de Potencial em Longo Prazo (LTP).

LTP é um aumento na eficiência sináptica que ocorre em junções monossinápticas, resultante da estimulação de alta frequência. Esta forma de plasticidade sináptica tem fundamentado o mecanismo neural do aprendizado e estocagem de memória no cérebro (ROGAN E LEDOUX, 1995).

Uma das principais hipóteses sobre desnutrição está relacionada com a diminuição neurofisiológica da plasticidade como sendo um crítico mecanismo ligado a déficits de aprendizado observados como resultado de insultos nutricionais durante o desenvolvimento do cérebro. Como citado anteriormente o LTP é um modelo sináptico da memória representando uma alteração duradoura na eficácia sináptica seguida de uma ativação aferente. Cérebros desnutridos possuem certa dificuldade de induzir e manter o LTP. Por outro lado, estudos de pulso-pareado monitorando eventos inibitórios na formação hipocampal, em estudos de desnutrição, têm mostrado aumento da inibição, refletindo em uma diminuição da plasticidade observada em insultos nutricionais durante o desenvolvimento do cérebro (MORGANE *et al.*, 2002).

Foram relatadas alterações eletrográficas e comportamentais correlacionadas ao abrasamento por estímulo elétrico no hipocampo, provocado por desnutrição protéica pré-natal, onde ocorreu um atraso no aparecimento de respostas características ao fenômeno, evidenciando uma plasticidade neural diminuída (BRONZINO *et al.*, 1986).

No entanto nem toda neuroplasticidade é benéfica, pois podem gerar comportamentos disfuncionais constituindo alterações psicológicas ou até quadros fisiopatológicos (KANDEL *et al.*, 1991).

A plasticidade exerce um importante papel em resposta às injúrias. Análise histológica em humanos ou animais experimentais, induzidos por modelo de epilepsia de lobo temporal, revelou alterações patológicas no hipocampo (REPRESA *et al.*, 1995), região envolvida na cognição, sendo tais alterações responsáveis por prejuízos em processos cognitivos (SUTULA *et al.*, 1994). O aparecimento de crises recorrentes espontâneas no modelo de epilepsia de lobo temporal, induzido pela pilocarpina, é resultante de uma neuroplasticidade maléfica e disfuncional gerando um quadro patológico. Ainda, exposição a estímulo sonoro agressivo induzindo um trauma coclear, durante um período crítico de crescimento e desenvolvimento do SNC, promove uma sensibilidade em longo prazo de crises convulsivas provocadas por som em ratos Wistar (PIERSON & SWAAN, 1991), evidenciando neuroplasticidade disfuncional e promovendo um quadro patológico. Foi descrita propriedade epileptogênica em fatias do colículo inferior (CI) de ratos imaturos (PIERSON *et al.*, 1989), e, sendo o colículo inferior no mesencéfalo uma das estruturas mais rostrais envolvidas na gênese da crise convulsiva, deste modo as crises audiogênicas requerem ativação de vias auditivas do tronco encefálico (FAINGOLD *et al.*, 1986). O núcleo central do CI é considerado a estrutura mais importante na via auditiva aferente cuja ativação é necessária para a origem da crise audiogênica, enquanto que o CI está envolvido na transdução sensorio-motora. O colículo superior (CS), substância negra e alguns núcleos reticulares também participam da modulação da crise audiogênica (GARCIA-CARAISCO, 2002).

2.3 – AS EPILEPSIAS

As epilepsias são desordens, envolvendo crises epilépticas espontâneas e recorrentes, convulsivas ou não convulsivas, causadas por descargas neurais hiper-sincronizadas. As crises epilépticas podem se manifestar sob diversas formas. Crises parciais são aquelas nas quais apresentam atividade eletroencefalográfica de uma rede neural epileptogênica limitada a uma porção definida do sistema nervoso central, subclassificadas em complexa ou simples na dependência de haver ou não perda da consciência. As crises parciais podem evoluir para crises complexas, e mesmo generalizadas, demonstrando o caráter dinâmico desta patologia na qual se evidencia o recrutamento de outras estruturas cerebrais. As crises generalizadas apresentam

atividade eletroencefalográficas indicando um acometimento bilateral de extensas áreas do encéfalo, com manifestações motoras tônico-clônicas, na qual após período de espasmos muscular generalizado apresentam contrações musculares rítmicas em todo o corpo. As crises generalizadas podem ainda se manifestar através de períodos de ausência em que se observa suspensão da consciência, sem importante atividade motora (ausência simples), ou acompanhada de discretas atividades motoras clônicas, atônicas, tônicas e autonômicas, e automatismos (ausências complexas) (ENGEL, 1995; TAYLOR & DUDEK, 1984).

Baseado em dados epidemiológicos de diversos países, o tipo mais freqüente de epilepsia em humanos são as crises parciais complexas, com ou sem generalização secundária, sendo que a maioria destas crises se origina no lobo temporal, principalmente no hipocampo e amígdala (LÖSHER, 1997). Há uma maior prevalência de epilepsia em países em desenvolvimento onde também ocorre um maior índice de desnutrição (HACKETT & IYPE, 2001).

Dos 40 a 50 milhões de pessoas epiléticas, nos quais 50% se iniciam na infância ou na adolescência, há estimativas de que 85% residem nos países em desenvolvimento. A incidência em países em desenvolvimento praticamente dobra em relação aos países desenvolvidos e uma das razões para essa maior incidência é o maior risco de experiência ou condições, que podem levar a dano cerebral permanente (WHO, 2001). Embora a desnutrição e a epilepsia sejam problemas prevalentes em países em desenvolvimento (DIOP *et al.*, 2003), até o presente momento não foi demonstrado aumento do risco de epilepsia pela desnutrição. A alta prevalência da epilepsia infantil nesses países é apontada por estudos epidemiológicos (HACKETT *et al.*, 1997).

No entanto, infecções que acometem o SNC e complicações perinatais, infecções tipicamente tropicais como malária, infecções como a meningite bacteriana (HACKETT & IYPE, 2001), parasitoses como neurocisticercose que, embora não tipicamente tropical, está relacionada à pobreza e desnutrição (WHO, 2001), e ainda a diminuição da resistência a infecções por vírus que apresentam tropismo pelo SNC causadores de epilepsia (CHANDRA, 1997), são sugeridas como fatores etiológicos. A desnutrição e a epilepsia podem, portanto, coexistir constituindo importante problema de saúde pública (HACKETT & IYPE, 2001).

No Brasil, onde estudos epidemiológicos mostram prevalência da epilepsia semelhante aos países em desenvolvimento, um estudo sobre a prevalência da epilepsia na população urbana de São José do Rio Preto, SP, mostra uma forte

associação entre a epilepsia e as classes sociais. As prevalências de epilepsia acumulada das classes A e B são baixas, semelhantes às dos países desenvolvidos e nas classes C e D são elevadas, semelhantes às observadas em países em desenvolvimento (BORGES, 2002).

O estudo dos mecanismos neurais correlacionados com a epileptogênese é dependente do uso dos modelos experimentais, atualmente divididos em dois grandes subgrupos: os agudos e os crônicos. Os modelos agudos são aqueles nos quais um único estímulo desencadeador induz uma crise; já nos modelos crônicos, vários estímulos são efetuados e a evolução das crises é observada. No entanto existem modelos que possibilitam uma dupla interpretação sobre sua característica aguda ou crônica, os quais são modelos induzidos por drogas (TURSKI *et al.*, 1987), estimulação elétrica (GODDARD, 1967; RACINE, 1972), lesões (FISHER, 1989; MCCOWN *et al.*, 1984), trauma coclear induzido por estimulação acústica (PIERSON, 1991), alguns dos quais, mesmo apresentando crise aguda, podem apresentar crises espontâneas. Um modelo clássico de epilepsia de lobo temporal é o de crises recorrentes espontâneas, no qual o rato é mantido em *status epilepticus* induzido pela pilocarpina por um período de noventa minutos e após um período de latência, o animal começa a apresentar crises recorrentes espontâneas.

2.4 – EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL

Desde o final do século XIX, vários estudos têm sido realizados para determinar a estrutura da formação do hipocampo. O corno de Amon pode ser considerado um agregado de estruturas similares, conectadas reciprocamente, podendo ser dividido em CA1, CA2, CA3 e CA4; além de outras regiões como o giro denteado e subículo, que compõem essa estrutura (LORENTE de NÓ, 1934). Mais recentemente, (WITTER & AMARAL, 1995), descreveram anatomicamente, que a formação do hipocampo estende-se do núcleo septal até o diencéfalo e é composta por várias regiões: giro denteado, rico em células granulares; hilo; corno de Amon, repleto de células piramidais, subdividido em camadas (CA1, CA2 e CA3); subículo; pré-subículo; e córtex entorrinal. O critério utilizado para essa divisão é considerar estruturas que se ligam predominantemente por projeções unidirecionais, sendo que o córtex perirrinal não é incluso por possuir conexões bidirecionais com o córtex entorrinal. As células granulares recebem ainda aferências diretas do córtex entorrinal, a chamada via perfurante. As células granulares por sua vez projetam seus axônios (fibras musgosas)

para as piramidais de CA3 que por sua vez fazem contatos com as piramidais de CA1 (colaterais de Schafer). Por outro lado, a saída excitatória das células granulares é controlada por células em cesto que inibem tais células. As células em cesto recebem aferências de células musgosas que são excitadas pelas células granulares, formando um circuito local. O hipocampo recebe ainda aferências da amígdala, do tálamo e ele projeta eferências para amígdala, núcleos septais e tálamo, entre outras estruturas.

Segundo (MCNAMARA, 1994), existem pelo menos duas teorias que tentam explicar como o hipocampo estaria envolvido na iniciação das crises recorrentes espontâneas (CRE). A teoria das células em cesto dormentes (SLOVITER, 1991, SLOVITER, 1994) postula que a perda de células musgosas presentes no hilo do giro denteado (SLOVITER, 1991), induz a uma perda da excitação das células em cesto, que por sua vez deixam de inibir as células granulares. Por conseqüência, tais células passam a apresentar maior saída excitatória. Por outro lado, a teoria do brotamento das fibras musgosas das células granulares (TAUCK & NADLER, 1985) postula que a perda do alvo das células granulares, provocada pela morte das células musgosas, induz um brotamento axonal nas células granulares em direção à camada granular, criando um circuito recorrente excitatório. Vale a pena ressaltar que uma teoria não exclui a outra, sendo que o aumento da saída excitatória das células granulares pode ocorrer pela ação sinérgica da perda da inibição das células granulares e pelo brotamento recorrente excitatório de seus axônios.

As fibras musgosas têm como propriedade possuírem alta concentração de zinco, permitindo a sua visualização por técnicas como o Neo-Timm (TIMM, 1958).

2.5 – MODELO DE CRISES RECORRENTES ESPONTÂNEAS PROVOCADAS POR INJEÇÃO SISTÊMICA DE PILOCARPINA.

O modelo de injeção sistêmica de pilocarpina caracteriza-se pela ocorrência de *Status Epilepticus* produzido por altas doses de pilocarpina (320-380 mg/kg). O *Status Epilepticus* é caracterizado por crises repetidas durante um longo período. Tais crises são geralmente abortadas com o uso de tionebutal ou diazepam. Após um período latente, ocorrem crises recorrentes espontâneas (CRE), mimetizando as crises parciais complexas e a patologia associada de esclerose hipocampal e modificação sináptica encontrada em humanos com crises intratáveis de lobo temporal (TURSKI *et al* 1983, LEITE *et al*, 1990). A intensidade das modificações sinápticas, a freqüência e a latência

para as CRE são determinadas pela duração do SE (LEMOS & CAVALHEIRO, 1995). Tais mudanças caracterizam-se por reorganização sináptica nos axônios das células granulares do hipocampo em que o mencionado fenômeno de brotamento está relacionado indiretamente à plasticidade no hipocampo com as CRE (MELLO *et al*, 1993).

Um mecanismo proposto para a propagação das crises induzidas por pilocarpina é que ocorre inicialmente a ativação das vias colinérgicas muscarínicas cujos eferentes ativam vias glutamatérgicas. O que reforça a hipótese desse mecanismo é o fato de que é possível bloquear crises induzidas por pilocarpina por meio do pré-tratamento com antagonistas colinérgicos. No entanto, o tratamento com esses mesmos antagonistas após a instalação do SE não bloqueia as crises (TURSKI *et al*, 1984). Portanto, a iniciação das crises é feita por agonista colinérgico, mas a manutenção é glutamatérgica.

Dados que reforçam essa hipótese mostram que regiões lesadas pelo SE induzido por pilocarpina não são necessariamente aquelas onde existe grande presença de receptores colinérgicos (Wasterlain & Shirasaka, 1994). Sendo assim, a excitotoxicidade induzida pela excessiva liberação de glutamato seria responsável pelas amplas lesões observadas.

2.6 – SINAPSE E O SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

Os impulsos nervosos são transmitidos de um neurônio para o seguinte através de junções interneuronais chamadas sinapses. A maioria das conexões das células nervosas é conhecida por sinapse química. As células pré e pós-sinápticas são separadas eletricamente pela fenda sináptica. Uma mudança de potencial elétrico na célula pré-sináptica provoca, por exocitose Ca^{2+} -dependente, a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica que se ligará a sítios receptores da membrana do neurônio pós-sináptico, transmitindo desta forma o impulso nervoso. No cérebro humano, a comunicação entre os neurônios se dá por contatos sinápticos que utiliza na sua maior parte, os aminoácidos como transmissores (NICHOLLS, 1993).

O glutamato é um aminoácido não essencial que não atravessa a barreira hematoencefálica, por isso, não é fornecido ao cérebro pela circulação. No entanto ele é sintetizado nos terminais pré-sinápticos a partir da glutamina, por meio da ação da enzima glutaminase, podendo também provir do α -cetoglutarato, via glutamato

desidrogenase e α -cetoglutarato aminotransferases (SCHOUSBOE *et al.*, 1997). É armazenado em vesículas onde pode chegar às concentrações de até 100 mM (NEDERGAARD, 2002). A captação vesicular é Na^+ -independente através da ação de transportadores de membrana, sendo sua incorporação possível devido a um potencial interno de membrana positivo que é gerado por uma H^+ -ATPase vacuolar, a qual medeia o transporte de H^+ para dentro da vesícula (NAITO e UEDA, 1985). As enzimas de síntese e degradação do glutamato têm sido encontradas predominantemente nos neurônios e nas células gliais, dois principais componentes do encéfalo (DINGLELINE e McBAIN, 1994).

O ácido glutâmico é um aminoácido com grande número de funções biológicas. Nos animais ele está ligado ao metabolismo do carbono e nitrogênio, e em casos de necessidade orgânica pode servir como fonte de energia. O glutamato é o aminoácido mais abundante no cérebro de muitos animais. Ele está presente no cérebro de mamíferos em uma concentração aproximada de 12 mM. Localiza-se principalmente em certas estruturas como hipocampo e tronco cerebral. Nos neurônios glutamatérgicos, o glutamato está em grandes concentrações por toda extensão celular, mas ele é particularmente abundante na região pré-sináptica, onde existem as vesículas carregadas com neurotransmissores que serão liberados mediante estímulo (ERECINSKA e SILVER, 1990; MASSENSINI, 1996).

Na despolarização dos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos, ocorre a liberação do glutamato das vesículas para a fenda sináptica por exocitose dependente da concentração de cálcio citossólico (VESCE *et al.*, 1999), interagindo com receptores glutamatérgicos (GluRs) ionotrópicos (iGluRs) e/ou metabotrópicos (mGluRs) localizados nas membranas pós-sinápticas e gliais (GALLO e GHIANI, 2000; MELDRUM, 2000). A concentração de glutamato na sinapse no período pré-liberação é de 2-5 $\mu\text{mol/L}$, podendo chegar a 5-100 $\mu\text{mol/L}$ depois da despolarização (DAIKHIN e YUDKOFF, 2000).

Após a promoção do influxo iônico nas células gliais e neuronais, e a modulação de segundos mensageiros, o glutamato é removido rapidamente da fenda sináptica por sistemas de transporte dependentes de sódio, localizados predominantemente nas células gliais (DANBOLT, 2001).

A captação de glutamato tem vital importância na manutenção de baixas concentrações extracelulares deste neurotransmissor (ANDERSON e SWANSON, 2000; DAIKHIN e YUDKOFF, 2000) além de prover glutamato para a síntese de GABA (TILLAKARATNE *et al.*, 1995), e glutathiona para a liberação de energia (DANBOLT,

2001). A captação de glutamato desempenha papel importante como acoplador da atividade neuronal com o metabolismo da glicose em astrócitos (MAGISTRETTI *et al.*, 1999).

Após a captação astrocitária, o glutamato é transformado pela glutamina sintetase em glutamina. Esta é transportada para os neurônios, convertida pela glutaminase a glutamato, que pode ser captado pelas vesículas sinápticas e liberado novamente, recomeçando o processo (SCHOUSBOE *et al.*, 1997; ANDERSON & SWANSON, 2000; AMARA & FONTANA, 2002). A regeneração do glutamato a partir da glutamina fecha o ciclo glutamato-glutamina, o qual promove: rápida remoção do glutamato da sinapse; conversão no astrócito do glutamato em glutamina, um composto não neuro-ativo, o qual permite a volta do glutamato para os neurônios; mecanismo para regeneração do glutamato no compartimento neuronal; provisão dos neurônios com substrato metabólico, uma vez que a glutamina pode ser utilizada como fonte energética em potencial; mecanismo para tamponamento da amônia, substância potencialmente neurotóxica, via glutamina sintetase (DAIKHIN & YUDKOFF, 2000).

O glutamato é o mais abundante aminoácido excitatório neurotransmissor no sistema nervoso central de mamíferos atuando em receptores metabotrópicos (mGluRs) acoplados a proteína G, modulando a produção de segundos mensageiros e são divididos em 8 subtipos (mGluR1-8) (OZAWA *et al.*, 1998). Os mGluR1 e mGluR5 (Grupo I) são ligados via proteínas G à ativação da fosfolipase C. Os mGluR2 e mGluR3 (Grupo II) e os mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8 (Grupo III) estão negativamente correlacionados à ativação da adenilato ciclase (CHAPMAN, 2000).

Já os receptores ionotrópicos (iGluRs), responsáveis pela iniciação, propagação e amplificação do sinal glutamatérgico (COTMAN *et al.*, 1995), são canais iônicos cátion-específicos e são subdivididos em três subtipos: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), kainato (os quais estão associados a canais independentes de voltagem e são permeáveis a Na^+ e K^+ , sendo que algumas subunidades são permeáveis ao Ca^{2+}) e N-metil-D-aspartato (NMDA) que são dependentes de voltagem, altamente permeáveis ao Ca^{2+} e de baixa permeabilidade ao Na^+ e K^+ , mediando a transmissão sináptica lenta. Sendo os dois primeiros denominados coletivamente de receptores não-NMDA (OZAWA *et al.*, 1998).

O canal do receptor NMDA é bloqueado por Mg^{2+} em neurônios em potencial de repouso, e a ativação deste receptor só ocorre se a membrana neural for previamente despolarizada pela ativação dos receptores AMPA, permitindo a saída do Mg^{2+} do interior do canal (EDMONS *et al.*, 1995). A ativação do receptor NMDA contribui para a

plasticidade neuronal e para a indução da potenciação de longa duração (LTP) e, por outro lado, a sua estimulação excessiva leva ao aumento de Ca^{+2} intracelular e morte celular (MODY & MACDONALD, 1995).

Os receptores NMDA são encontrados tanto em células neuronais quanto gliais (CONTI *et al.*, 1997). A expressão de suas subunidades varia muito no SNC, sendo o hipocampo e o córtex cerebrais, estruturas particularmente ricas neste receptor (WATKINS *et al.*, 1990).

A transmissão glutamatérgica pode estar relacionada ao aprendizado, à memória (IZQUIERDO e MEDINA, 1997), aos processos plásticos no cérebro (OZAWA *et al.*, 1998), à transdução central e à fisiopatologia da morte neuronal após injúria cerebral (BUGGY *et al.*, 2000), proliferação e migração celular (MCDONALD & JOHNSTON, 1990). A neurotransmissão glutamatérgica também desempenha papel crucial no desenvolvimento e manutenção de crises convulsivas, as quais estão presentes no fenômeno epiléptico. Além disso, pronunciada liberação de glutamato seguida da ativação de receptores (NMDA), (AMPA) e kainato assim como os receptores metabotrópicos vêm sendo associados a excitotoxicidade provocada pelo glutamato e morte neuronal em várias estruturas durante o *status epilepticus* (SE) (MILLAN *et al.*, 1993).

A liberação de glutamato na sinapse é processada de duas formas: via exocitose de vesículas carregadas com o neurotransmissor e que depende de íons cálcio (SANCHEZ-PRIETO *et al.*, 1987) e via cálcio independente que ocorre pela reversão do transportador de alta afinidade do pool de glutamato do citoplasma (ROMANO-SILVA *et al.*, 1994).

A despolarização por altas concentrações de KCl é muito efetiva na promoção da liberação de glutamato de sinaptossomas de ratos. Provavelmente, uma associação das vesículas contendo glutamato e um tipo de canal de cálcio sensível à voltagem é aberto durante a despolarização da membrana, promovendo a entrada de cálcio e aumentando sua concentração em níveis requeridos para estimular a exocitose (ROMANO-SILVA *et al.*, 1993). Com a exposição à concentração muito alta de KCl verifica-se a despolarização, com conseqüente aumento de cálcio intracelular, facilitando a liberação de glutamato (HERTZ & PENG, 1992). Para uma revisão mais pormenorizada sobre o presente tema ver SCHWEIGERT (2005).

2.7 – VÍDEO-ELETROENCEFALOGRAFIA

Registros eletrofisiológicos (EEG) possuem uma boa resolução temporal, possibilitando uma análise em tempo real da atividade elétrica do SNC. A análise da expressão comportamental de uma crise convulsiva, em conjunto com avaliações funcionais e morfológicas, pode mostrar o envolvimento de regiões do encéfalo durante o período ictal da epilepsia (GARCIA-CARAISCO *et al.*, 1992).

Racine e colaboradores (1972), observando a progressão comportamental de crises límbicas induzidas por estímulos subliminares repetidos, descreveram uma tabela com valores que variam de 1 a 5, conforme mostrado no quadro abaixo.

Índice de gravidade de crises límbicas (Racine, 1972)

| Índice | Comportamento |
|--------|-------------------------------------|
| 0 | Imobilidade |
| 1 | Automatismos faciais |
| 2 | Mioclonias de cabeça e pescoço |
| 3 | Clonias de patas anteriores |
| 4 | Elevação sobre as patas posteriores |
| 5 | Elevação e queda |

Uma melhor correlação entre os circuitos neurais e as manifestações motoras associadas às crises convulsivas pode ser alcançada pelo registro simultâneo de vídeo e eletroencefalograma (MORAES *et al.*, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- MODELO EXPERIMENTAL

O modelo experimental está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal conforme projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) sob o protocolo nº 009/05.

Foram utilizados ratos da raça Wistar para formar os quatro grupos experimentais que foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Grupo de animais normonutridos com indução ao *status epilepticus* pela pilocarpina – Após o acasalamento, perfazendo duas semanas, as fêmeas foram separadas e alimentadas *ad libitum* com ração para ratos NUVILAB[?] (PR, Brasil) suplementada em 25% com ração para cães BONZO[?] (SP, Brasil). A partir do 18º dia, após o acasalamento, foi avaliado, diariamente, o consumo de ração pelas mães e após o desmame pelos filhotes para cálculo da quantidade de ração que foi oferecida ao grupo de ratos submetidos à restrição de alimentos. Após o nascimento, os filhotes foram mantidos em número de oito por mãe. O desmame ocorreu aos 28 dias de vida. Após o desmame, 18 ratos machos foram mantidos em gaiolas individuais e receberam a mesma alimentação das mães. No 45º dia de vida, 18 animais foram injetados com uma dose de metil-escopolamina (1,0 mg/kg, i.p.) e após 30 minutos foi administrado cloridrato de pilocarpina (320 mg/kg, i.p.). Noventa minutos após o começo do *status epilepticus*, foi injetado Diazepam NQ[?] (20 mg/kg, i.p.) para abortar o *status epilepticus*. Durante os 2-3 dias subseqüentes, os ratos foram hidratados com Pedialyte[?] via oral, por gavagem, em intervalos de 2 horas. Após um período de recuperação, os ratos foram monitorados por câmara filmadora por um período de seis horas diariamente. Em um grupo de seis animais foi realizada a cirurgia estereotáxica com implantação de eletrodo profundo e posterior avaliação do vídeo-EEG, seguindo-se perfusão e histologia para verificação dos sítios de registro. Aos 120 dias de vida um grupo de seis animais foi submetido aos procedimentos, descritos abaixo, para realização da marcação histoquímica pelo Neo-Timm. Os animais restantes foram sacrificados aos 120 dias e submetidos aos demais ensaios biológicos.

Grupo de animais normonutridos sem indução ao *status epilepticus* pela pilocarpina – Grupo de 18 animais normonutridos, como descrito acima, foi administrado salina i.p., ao invés de pilocarpina. Noventa minutos após o a administração de salina foi injetado Diazepam NQ[?] (20 mg/kg,i.p.). Após um período cinco dias, os ratos foram monitorados por câmara filmadora, por um período de seis horas diariamente. Do grupo de 18 animais, em 6 foram realizadas cirurgias estereotáxicas, com implantação de eletrodo profundo e posterior avaliação do vídeo-EEG, seguida de perfusão e histologia para verificação dos sítios de registro. Aos 120 dias de vida um grupo de seis animais, dos 18 ratos tratados, foi submetido aos procedimentos, descritos abaixo, para realização da marcação histoquímica pelo Neo-Timm. Os animais restantes do grupo foram sacrificados aos 120 dias e submetidos aos demais ensaios biológicos.

Grupo de animais com restrição de alimentos e indução ao *status epilepticus* pela pilocarpina – O protocolo para acasalamento e alimentação descrito no item anterior foi seguido e as fêmeas foram alimentadas com 60% da quantidade de dieta ingerida pelo grupo normonutrido, a partir do 18^o dia do acasalamento. O número de filhotes foi fixado em oito por mãe. O desmame ocorreu aos 28 dias de vida e após o desmame 18 ratos machos foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo a mesma alimentação das mães. No 45^o dia de vida, os 18 ratos receberam uma dose de metil-escopolamina (1,0 mg/kg, i.p.), após 30 minutos foi administrado cloridrato de pilocarpina (320 mg/kg, i.p.). Noventa minutos após o começo do *status epilepticus* foi injetado Diazepam NQ[?] (20 mg/kg, i.p.) para abortar o *status epilepticus*. Durante os 2-3 dias subseqüentes os ratos foram hidratados com Pedialyte[?] via oral, por gavagem, em intervalos de 2 horas. Após um período de recuperação, os ratos foram monitorados por câmara filmadora, por um período de seis horas diariamente. Do grupo acima, em 6 animais foi realizada a cirurgia estereotáxica com implantação de eletrodo profundo e posterior avaliação do vídeo-EEG, seguida de perfusão e histologia para verificação dos sítios de registro. Aos 120 dias de vida um grupo de seis animais, dos 18 animais tratados, foi submetido aos procedimentos, abaixo descritos, para realização da marcação histoquímica pelo Neo-Timm. Os animais restantes foram sacrificados aos 120 dias e submetidos aos demais ensaios biológicos.

Grupo de animais com restrição de alimentos sem indução ao *status epilepticus* pela pilocarpina – Grupo de 18 animais com restrição de alimentos, conforme protocolo acima, foi injetado salina i.p., ao invés de pilocarpina e serviu de controle. Em um grupo de seis animais foi realizada a cirurgia estereotáxica com implantação de eletrodo profundo e posterior avaliação do vídeo-EEG, seguida de perfusão e histologia para verificação dos sítios de registro. Aos 120 dias de vida, dos 18 animais, um grupo de seis ratos foi submetido aos procedimentos, descritos abaixo, para realização da marcação histoquímica pelo Neo-Timm. Os animais restantes do grupo foram sacrificados aos 120 dias e submetidos aos demais ensaios biológicos.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Reagentes

Ácido cítrico, Ácido Desoxirribonucléico (Tipo III de Salmão), Albumina Bovina (Fração V), Brometo de Etídio (Brometo de 2,7-diamino-10-etil-9-fenilfenantrídio), Reagente de Folin & Ciocalteu (2,0 N), L-ácido glutâmico, HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid?), γ -NADP (γ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), L-glutamato desidrogenase, Ribonuclease A e Uretana foram adquiridos de SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA. Cloreto de Potássio e Cloreto de Sódio foram adquiridos de REAGEN – Quimibrás Indústrias Químicas S.A. – RJ – Brasil. Carbonato de Sódio, Cloridrato de pilocarpina, Fosfato ácido de potássio e glicose foram adquiridos de MERCK S.A – Indústrias Químicas, RJ, Brasil. Hidróxido de sódio e Tris base [Tris-(hidroximetil)-aminometano] foram adquiridos de LABORCLYN – Produtos para Laboratórios LTDA. Sulfato de Cobre e Tartarato de sódio e potássio foram adquiridos de INLAB S.A. Fosfato de Sódio Bibásico, Fosfato de Sódio Monobásico, Glutaraldeído P.S. (Solução 25% em água), Hidroquinona e Sulfeto de Sódio foram adquiridos de Synth – Labsynth Produtos para Laboratório LTDA. Nitrato de Prata foi adquirido de Cennabras – Indústria e Comércio LTDA.

3.2.2 Equipamentos

Banho com agitação e temperatura regulável, modelo BT-25 YAMATO SCIENTIFIC CO, Japão. Espectrofotômetro modelo SHIMADZU, modelo UV 160 A, Japão. Detector espectrofluorométrico Shimadzu RF-551 (Kyoto, Japão).

Homogeneizador de tecidos Potter Elvehjem. Fatiador de tecidos, McIlwain (BRINKMANN INSTRUMENTS, England). Centrífuga refrigerada, modelo CR 21 da HITACHI, Japão. Fluorímetro. Microscópio Zeiss-Stemi 2000C. Câmera CCD Fujitsu TCZ 984-P. Sistema de Registro do EEG: Gaiola de Faraday (NNC/UFMG). Placa conversora analógico-digital (A/D) modelo NI-DAQ 6023E, da National Instruments, Inc. Módulos condicionadores, Amplificador/filtro, os quais filtram com uma banda de passagem de 0,23 a 200 HZ e amplificam o sinal, com ganho programável variando de 100 a 2.000 vezes (NNC/UFMG). Computador de registro.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 – Confeção dos Eletrodos

Os registros de eletroencefalografia foram realizados com a utilização de um eletrodo superficial, posicionado no córtex parietal esquerdo (CPE) e dois eletrodos profundos, monopolares, localizados: um no hipocampo dorsal e outro na amígdala. Os eletrodos superficiais foram confeccionados com micro-parafusos cirúrgicos Fine Science Tools (Nº 19010-00), soldados a fios de aço revestidos com Teflon (mod. 7916, A&M Systems). Os eletrodos monopolares foram confeccionados com fios de aço revestidos com Teflon (mod. 7916, A&M Systems).

Os terminais de conexão, colocados na cabeça dos animais, foram feitos com conector de telefone de 06 vias (RJ11-6), o qual proporciona um contato firme entre o animal e o sistema de aquisição de sinais. Os conectores RJ11-6 foram grampeados a fios metálicos encapados com cores diferentes. O primeiro fio, da direita para a esquerda (olhando-se o conector com a trava para trás), foi soldado a um parafuso cirúrgico, servindo como eletrodo de referência, e os outros cinco fios subseqüentes foram deixados livres para registro, na seguinte ordem: 1- Córtex, 2- Amígdala, 3- Hipocampo, os outros dois foram desprezados.

3.3.2 – Cirurgia para Implante de Eletrodos com Capacete

Os ratos foram anestesiados com Tiopental sódico (40 mg/kg i.p.). Logo após a anestesia foi injetado atropina diluída em salina a 2% (0,1 mL/rato i.p.), para a prevenção de arritmias cardíacas e hipersecreção brônquica secundários ao uso do

anestésico. Posteriormente, foi injetado Pentabiótico Veterinário pequeno Porte (Forte Dodge®) (0,1 mL/rato i.m.) para cobertura antibiótica profilática.

O procedimento cirúrgico pode ser visualizado na fig. 1. A seguir estão descritos os passos seguidos para a realização do procedimento:

Fazer a tricotomia da cabeça; fixar o animal a um estereotáxico modelo Stoelting por meio das barras auriculares. Fazer injeção subcutânea, sobre o local da cirurgia, de Xylocaína 2%, utilizando seringa odontológica, seguida por massagem local para melhor difusão do anestésico. Fazer uma incisão elíptica com centro à altura da linha interauricular anterior. Remover a gordura subcutânea e limpar o osso com salina estéril. Esperar secar o osso. Colocar a torre do estereotáxico e nivelar bregma e lâmbda. Marcar os pontos de perfuração para inserção dos eletrodos em suas respectivas coordenadas: hipocampo, AP - 4,0 mm, com referência ao bregma, LL - 2,6 mm, com referência a linha média, DV - 2,5 mm, tendo como referência a dura-máter e na amígdala, AP - 2,8 mm, com referência ao bregma, LL -5,0 mm, com referência à linha média, DV -6,0 mm, tendo como referência a dura-máter, ambas as coordenadas segundo o Atlas de (Paxinos e Watson, 1986). Perfurar o osso nasal esquerdo com a broca odontológica e colocar o parafuso de referência do conector RJ11-6. Perfurar o osso parietal esquerdo e colocar o eletrodo superficial. Perfurar o osso para a introdução dos eletrodos profundos conforme as coordenadas previamente marcadas, introduzir os eletrodos e fixá-los com cimento de zinco. Cobrir a superfície óssea com camada de acrílico odontológico. Esperar secar o acrílico. Soldar os fios de EEG ao conector. Fazer o acabamento final com acrílico.

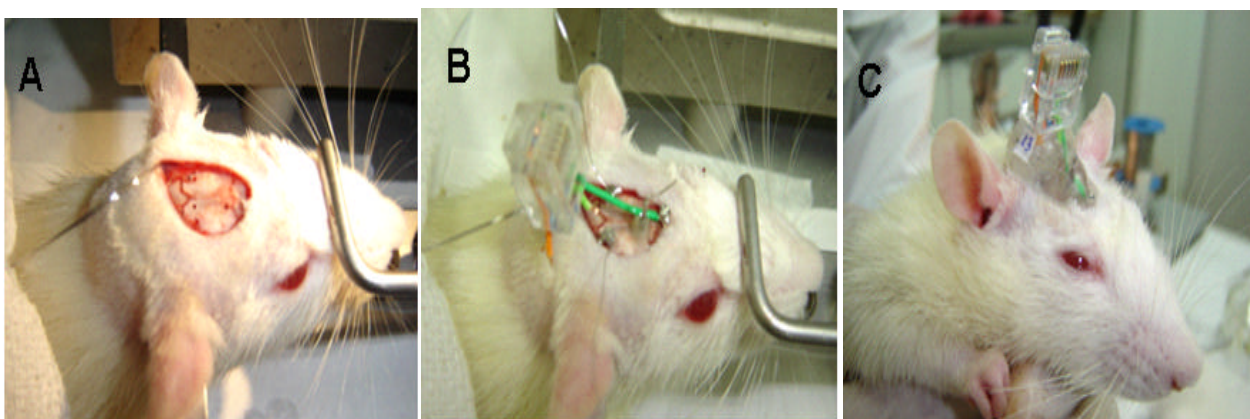


Fig. 1- Etapas do procedimento de implantação dos eletrodos superficial e profundo, (ver descrição do procedimento no texto).

3.3.3 – Cuidados Pós-Operatórios

Após a cirurgia, os ratos foram colocados em gaiolas individuais sob aquecimento até saírem da anestesia. Após acordarem, os ratos eram transferidos para suas respectivas gaiolas, com manutenção da dieta inerente a cada grupo, por um período de sete dias (tempo suficiente para a eliminação do anestésico e da atropina).

3.3.4. – Procedimento de Registro Vídeo-EEG

Para a realização dos registros, os animais foram colocados numa gaiola de acrílico revestida com uma tela metálica fina, em um arranjo que se denomina gaiola de Faraday. Os registros foram realizados sempre nos mesmos horários, ou seja, das 08:00 às 14:00 horas. Os canais de registro foram: (1) córtex parietal esquerdo (CPE); (2) Amígdala; (3) hipocampo dorsal.

Na gaiola de Faraday, o terminal de conexão dos animais foi acoplado a um pré-amplificador. Esse dispositivo tem como função impor uma alta impedância de entrada aos sinais de EEG e amplificá-los em 05 vezes, sem trazer impedimentos à livre movimentação do animal. Em seguida, os sinais passaram por módulos condicionadores, os quais filtram com uma banda de passagem de 0,23 a 200 HZ e amplificam ainda mais o sinal, com ganho programável variando de 100 a 2.000 vezes. Foi, então, direcionado para uma placa conversora analógico-digital (A/D) modelo NI-DAQ 6023E, da National Instruments, Inc. A amplificação final foi de 2.000 a 10.000 vezes. O programa utilizado para a aquisição foi o NNC-DAQ, de autoria do professor Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes (Núcleo de Neurociências, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG). Os registros foram realizados utilizando-se uma frequência de amostragem de 2 KHz.

Registramos os animais em um sistema de vídeo-EEG, de forma a armazenar os registros e, simultaneamente, obter fitas de vídeo com o comportamento do animal. Nesse sistema, conectamos a câmera filmadora a um vídeo cassete, que grava o comportamento. A saída do vídeo é ligada a uma entrada de placa de vídeo do computador. Na tela do computador, nós visualizamos a imagem captada pela câmera (imagem simples) e o software de registro. A imagem simples combinada com a tela de registros constitui a imagem composta. A imagem composta é direcionada para um segundo vídeo cassete, que é ligado a um televisor. Assim, gravamos duas fitas

cassete de cada animal: uma contendo a imagem simples e outra a imagem composta. O sistema de registro pode ser visualizado na Fig. 2.

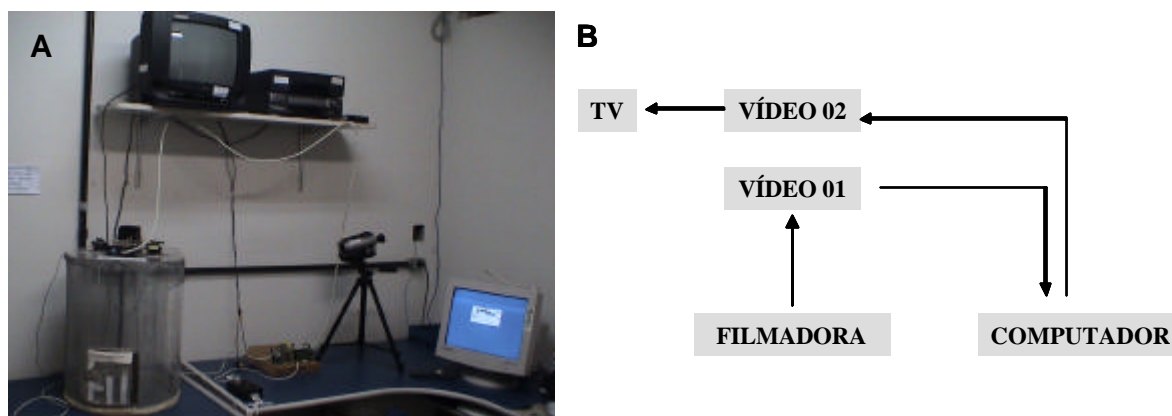


Fig. 2 – Em A, vemos os equipamentos utilizados para a aquisição dos registros. Em B, o desenho esquemático mostrando a forma pela qual esses equipamentos encontram-se interconectados.

3.3.5 – Perfusão e Histologia

Após o registro, os animais foram sacrificados com o procedimento de perfusão tanscardíaca, tendo sido antes anestesiados com uretana (140 mg/Kg de peso, i. p.) e a posição dos eletrodos foi marcada pela lesão eletrolítica gerada pela passagem de uma corrente de 1 mA por 5 segundos. Os animais foram perfundidos transcardiacamente com salina 0,9% e a seguir com formol a 10%. O cérebro foi extraído e mantido em formol a 10% durante pelo menos 24 horas.

As peças foram cortadas em vibrátomo (Modelo Vibratome), com espessura de 45 μm e montadas em laminas gelatinizadas. Após secagem, as laminas foram coradas com vermelho neutro e observadas em microscópio óptico para determinação dos sítios de registro. O processo de coloração seguiu os seguintes passos: Solução de vermelho neutro (8-10 minutos); Água destilada (1 mergulho); Etanol 70% (45 segundos); Etanol 95% (45 segundos); Etanol 100% (45 segundos); Etanol 100% (45 segundos); Etanol/xilol 1/1 (45 segundos); Xilol (45 segundos). Lâminas montadas com Entellan®.

3.3.6 – Marcação de Neo-Timm

Para a análise do brotamento axonal no hipocampo, foi usada a técnica de Neo-Timm (Timm, 1958; Mello *et al*, 1993) que se baseia na detecção histoquímica de vesículas de zinco.

Os ratos foram anestesiados com uretana (140 mg/kg i.p.) e perfundidos transcardiacamente com uma seqüência de meios descritos no protocolo abaixo e ilustrados na figura 3:

a. Soluções usadas na perfusão

Preparação de 1000 mL de Tampão Millonigs para cada dois ratos:

3,88 g de Hidróxido de Sódio

16,56 g de Fosfato de Sódio monobásico monohidratado

0,02 g de Cloreto de Cálcio

2. Adicionar Sulfeto de Sódio a 0,1 % em 600 mL do Tampão Millonigs (0,1 g/100mL), momentos antes da perfusão.

3. Preparação do glutaraldeído a 3 %.

4. Antes da perfusão, adicionar heparina (1500 Unidades / 50mL) no Tampão Millonigs.

b. Perfusão

Perfundir na seguinte seqüência:

1. Millonigs com heparina (sem sulfeto) 50 mL/rato
2. Millonigs com sulfeto 50 mL/rato
3. Glutaraldeído 100 mL/rato
4. Millonigs com sulfeto 200 mL/rato

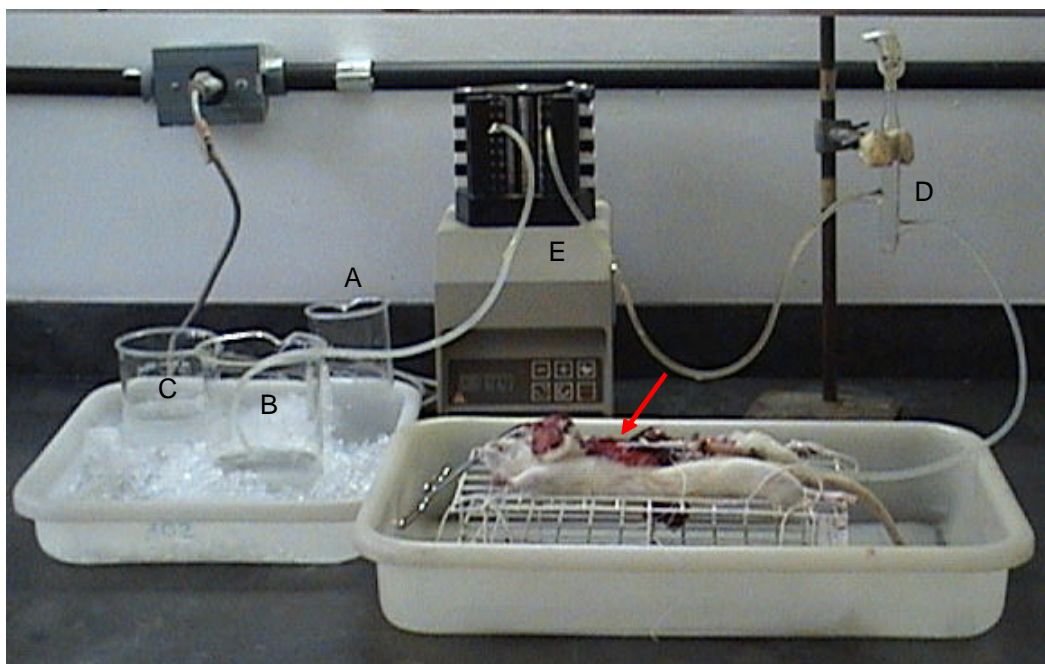


Figura 3: Foto ilustrativa da cirurgia para realizar a perfusão do rato, como parte do protocolo realizado para marcação histoquímica pelo Neo-Timm. (A) Millonigs com heparina, (B) Millonigs com sulfeto, (C) Glutaraldeído, (D) retentor de bolhas, (E) bomba de perfusão e a seta indica cânula inserida na artéria aorta através do coração. A cirurgia é realizada dentro de uma capela de exaustão.

c. Crioproteção

Remoção dos cérebros e estoque por 24 horas em sacarose a 15% em glutaraldeído a 3% contido em tubos (30 mL/cérebro)

d. Congelamento

Congelamento em nitrogênio líquido (-170°C) e posterior estocagem em Freezer -70°C.

e. Histologia

Os cérebros foram cortados no vibrátomo (Modelo Vibratome), em secções de 50 µm. As secções coronais foram feitas nos seguintes níveis, -3,30 mm a -4,80 mm A/P (referência bregma).

f. Revelação

1. Gelatinização das lâminas

1.1. Preparo da solução

Gelatina 2 g.

Água 400 mL, entre 50 e 60°C.

Agitar e resfriar.

Adicionar 0,2 g de alumínio cromo (sulfato cromo potássio)

1.2. Procedimentos:

1.3. Três minutos em etanol absoluto, 3 minutos em acetona, 5 minutos na gelatina e secar a 37°C.

2. Imersão das lâminas em uma solução reveladora a 21 °C. As lâminas são colocadas num suporte dentro de uma cuba escura, contendo água e gelo. O experimento é realizado numa câmara escura.

3. Preparação das duas soluções, sendo misturadas na hora da revelação:

Sol. A: Ácido Cítrico 10,25 g

Citrato de Sódio 9,45 g

Água: 30 mL

Sol. B: Hidroquinona 3,73 g

Água: 60 mL

Goma Arábica: 240 mL (500 g/L) – Prepara-se da seguinte maneira: Coloca-se água em banho maria (40°C) e então dilui a goma arábica lentamente, agitando com bastão de vidro. Quando estiver tudo diluído, filtra-se em gaze.

Nitrato de Prata: 2,0 mL (0,51g de AgNO_3 /3 mL água). Preparado e inserido somente no momento da revelação. O volume total da solução é suficiente para revelar 20 lâminas.

4. Mistura das soluções em uma câmara escura em cuba imersa em banho de água a temperatura de 21°C.

5. Revelar as lâminas por um tempo de 50 minutos.

6. Retirar o carrinho com as lâminas da cuba contendo Nitrato de prata e imergir em um recipiente contendo água destilada. Lavar durante 10 minutos.

7. Desidratação das lâminas por 2 minutos em cada solução, na seqüência: álcool a 70%, 95% e absoluto, seguido de xilol.

8. Montagem das lâminas (colocando as lamínulas com bálsamo do Canadá).

9. A avaliação dos cortes foi feita por densitometria óptica relativa, utilizando-se o programa "Image Tools v. 3.00" da Universidade do Texas.

3.3.7 – Procedimento para registro das imagens

As imagens foram capturadas em aumento fixo de 3,2 vezes, utilizando um sistema para análise de imagem, constituído de: um microscópio Zeiss-Stemi; câmara CCD; programa Microsoft Office Picture Manager, mantendo-se sempre as mesmas condições de luminosidade e posteriormente convertidas numa escala de cinzas de 8 “bits” para análise pelo programa “Image Tool” (Universidade do Texas, versão 3,00 – “freeware”). Numa etapa posterior, foi utilizada uma curva de calibração e níveis de cinza embutidas no programa, sendo que a escala dessa curva corresponde a 256 valores. Foram medidos os níveis de cinza na camada molecular interna do hilo do giro denteado em relação aos níveis de cinza do giro denteado, sendo considerado, como “background”, os níveis de cinza do tálamo ventral. Foi calculada a intensidade de cinza integrada dos valores de cinza por área e subtraído, desse valor, a intensidade de cinza obtida no tálamo.

3.3.8 – Determinação do Glutamato Liberado

Aos 120 dias de vida, os ratos foram decapitados e os cérebros rapidamente removidos e imersos em um meio de incubação Krebs-Ringer-Hepes (KRH) com a seguinte composição (em mM): 133 NaCl; 4,8 KCl; 1,2 KH₂PO₄; 1,2 MgSO₄; 1,5 CaCl₂; 11,1 glicose; 10 HEPES, pH 7,4. Para liberação do glutamato o meio continha KCl 40 mM.

Fatias do hipocampo com espessura de 0,35 mm foram preparadas em um fatiador de tecidos, modelo McIlwain Tissue Chopper (Brinkmann Instruments – England). Depois de homogeneizadas, cerca de 50 mg das fatias (cerca de 4 mg de proteína) foram suspensas em meio de incubação resfriado (gelo) em frascos de plástico. Cada frasco continha 3,0 mL do meio de incubação. As fatias foram lavadas 5 vezes com meio de incubação (refrigerado), centrifugado (1000 g) por 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e as fatias de tecido foram ressuspensas em 1,0 mL do KRH contendo 4,8 mM e 40 mM de KCl e incubado por 15 minutos a 37°C. A seguir foi coletado alíquota de 200 µL dos sobrenadantes, adicionaram-se 20 µL de NADP (concentração final de 1 mM), 15,5 µL de GDH (concentração final de 30U); completou-se o volume com 1700 µL de KRH e realizaram-se as leituras do NADPH formado em detector espectrofluorométrico Shimadzu RF-551 (Kyoto, Japão) com comprimento de

onda de excitação de 385 nm e de emissão de 450 nm (KITAYAMA *et al.*, 2001). Em seguida, a leitura era repetida após adição de padrão interno de 5 nmol de glutamato.

3.3.9 - Determinação de Proteína

A dosagem de proteína seguiu o método de LOWRY (1951), modificado por HARTREE (1972). Um homogeneizado do tecido foi preparado na concentração de 1:10. Exatamente 0,1 mL deste homogeneizado foi adicionado a 2,0 mL de NaOH 1N. Após incubar em banho aquecido (50°C) por 1 hora e esfriar completamente, desta solução foram feitas alíquotas de 150 µL em tubos de vidro em duplicata. Completou-se o volume com água destilada para um volume final de 1,0 mL.

Foram adicionados a cada tubo um volume de 0,9 mL da solução A (2,0 g de tartarato de sódio e potássio; 100,0 g de carbonato de sódio e 500,0 mL de solução de NaOH 1N) e aquecer em banho a 50°C por 10 minutos. Após resfriamento, adicionar um volume de 0,1 mL da solução B (2,0 g de tartarato de sódio e potássio; 1,0 g de CuSO₄.5H₂O e 10,0 mL de 1N NaOH), seguindo-se homogeneização. Após repouso por 10 minutos, na temperatura ambiente, adicionar 3,0 mL da solução C (1 volume de Folin-Ciocalteu (~2N) para cada 15 volumes de água destilada) em jatos, seguido de agitação vigorosa. Logo após, incubar no banho aquecido (50°C) por mais 10 minutos. Após resfriamento realizar a leitura das amostras no espectrofotômetro a 650 nm. Antes da leitura das amostras, confeccionar uma curva de proteína, utilizando a albumina bovina como padrão.

3.3.10 - Determinação de DNA

A determinação do DNA foi realizada procedendo-se de acordo com o método de PRASAD e colaboradores (1972), que se baseia na medida da fluorescência desenvolvida pelo brometo de etídio ao interagir com os ácidos nucléicos.

Partindo do homogenato de 1:10 preparado para a dosagem de proteínas, foi feita uma diluição 1:100. E seguiram-se os seguintes passos: Pipetar um volume de 0,2 mL do homogenato diluído e transferir para um tubo de ensaio. Adicionar um volume de 1,8 mL de tampão Tris-NaCl (pH entre 7,5-8,5) e 2,0 mL de solução de brometo de etídio (20 µg/mL). Todas as amostras e padrões foram feitos em duplicata. Acrescentar 30 µL de solução de ribonuclease (2,0 µg/mL), para a hidrólise de RNAs. Após

agitação, aquecer os tubos em banho a 50 °C, por uma hora. A fluorescência resultante foi lida no detector espectrofluorométrico Shimadzu RF-551 (Kyoto, Japão), utilizando o comprimento de onda 315/590 excitação/emissão, utilizando curva padrão. Os resultados foram expressos em miligramas de DNA por grama de tecido.

3.3.11 – Análise Estatística dos Dados

Os resultados foram tratados estatisticamente pelos métodos de Análise de Variância de Fator Único e pelo Teste de Duncan para séries múltiplas (GOMES-PIMENTEL, 1990).

4. RESULTADOS

4.1- EFEITO DA RESTRIÇÃO DE ALIMENTOS SOBRE A MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS

A massa corporal dos animais foi avaliada nas datas indicadas na fig. 4. O modelo de restrição alimentar utilizado no presente estudo não alterou o peso ao nascer. A partir da primeira semana de vida, foi observado que a desnutrição provocou uma redução significativa ($P < 0,05$) na massa corporal dos animais, sendo notada uma diferença de aproximadamente 45%, entre os animais alimentados *ad libitum* e os desnutridos aos 120 dias de vida. Aos sessenta dias de idade foi observada uma diminuição na massa corporal nos animais do grupo normonutrido por efeito da administração de pilocarpina, o que foi revertido após um mês de vida (90 dias). A mesma observação verificou-se entre os animais do grupo desnutrido e a diferença foi mantida até a época do sacrifício (120 dias). A observação pode ser justificada pela desidratação provocada pela pilocarpina utilizada para induzir o *status epilepticus* e a possível alteração no mecanismo de controle da ingestão de alimentos.

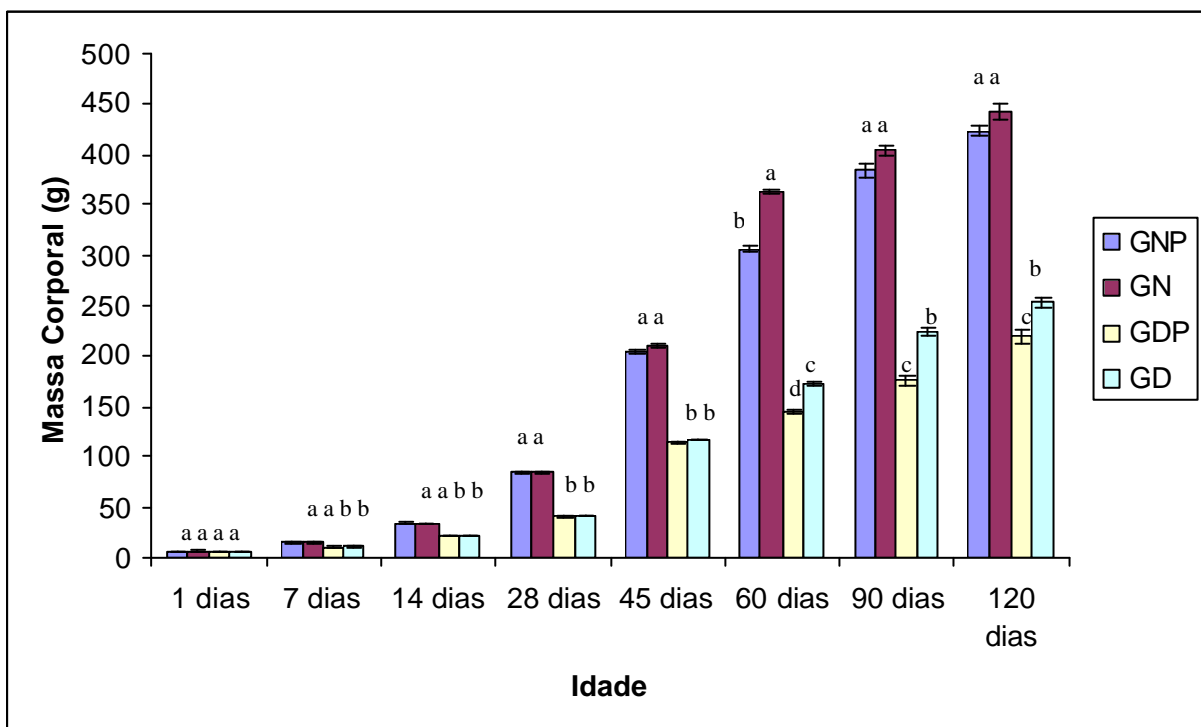


Figura 4: Efeito da restrição de alimentos sobre a massa corporal dos ratos. Os grupos GNP e GN, que representam o grupo de animais normonutridos, foram alimentados *ad libitum*. Já os grupos GDP e GD, que representam o grupo de animais desnutridos, receberam 60% da dieta oferecida aos grupos normonutridos. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) em animais da mesma idade. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

4.2- EFEITO DA RESTRIÇÃO DE ALIMENTOS SOBRE A MASSA DO ENCÉFALO AO SACRIFÍCIO.

Os pesos encefálicos dos animais dos grupos GNP, GN, GDP e GD estão mostrados na figura 5. Os encéfalos do grupo GDP pesaram 9,7% a menos ($P < 0,05$) em relação aos valores dos pesos dos encéfalos do grupo GNP e GN. Já os animais do grupo GD tiveram uma redução na massa do encéfalo de 7,4% ($P < 0,05$), quando comparados aos grupos de animais normonutridos. Os pesos encefálicos dos quatro grupos encontram-se no apêndice.

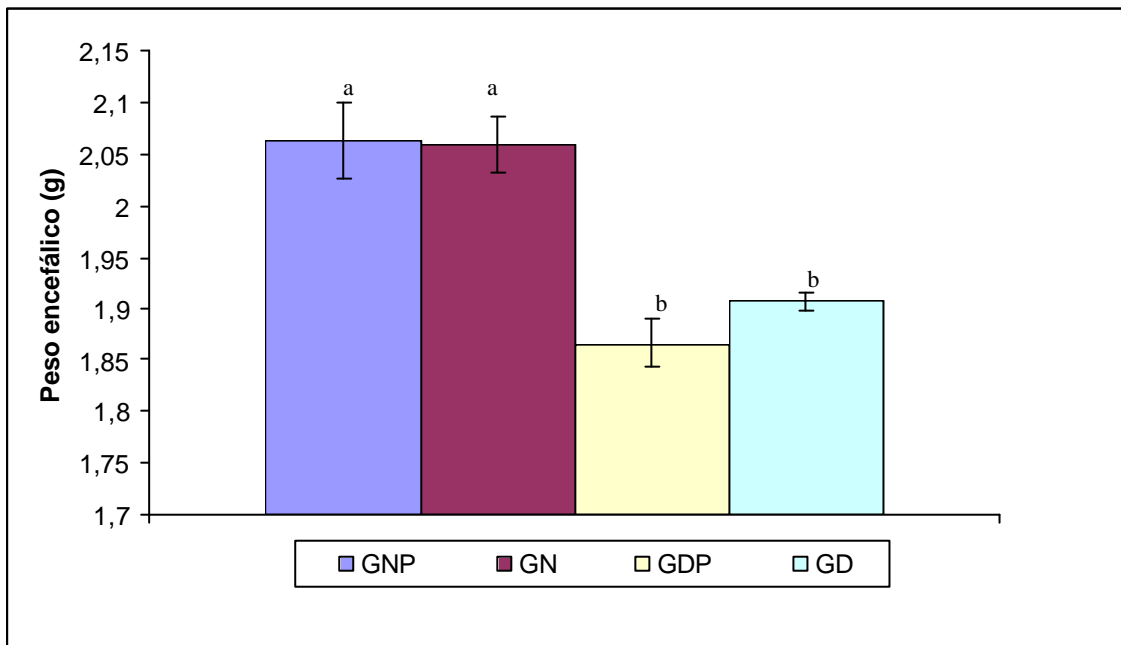


Figura 5: Efeito da restrição de alimentos sobre o peso encefálico dos ratos. Os grupos GNP e GN, que representam o grupo de animais normonutridos, foram alimentados *ad libitum*. Já os grupos GDP e GD, que representam o grupo de animais desnutridos, receberam 60% da dieta ingerida pelos animais normonutridos. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Os resultados são expressos como média \pm EPM.

4.3- EFEITO DA RESTRIÇÃO DE ALIMENTOS SOBRE A MASSA DO HIPOCAMPO AO SACRIFÍCIO.

O peso do hipocampo dos animais dos grupos GNP, GN, GDP e GD estão mostrados na figura 6. Os valores dos pesos dos hipocampos foram semelhantes entre os grupos, não apresentando diferença estatisticamente significativa. Os pesos dos hipocampos dos quatro grupos encontram-se no apêndice.

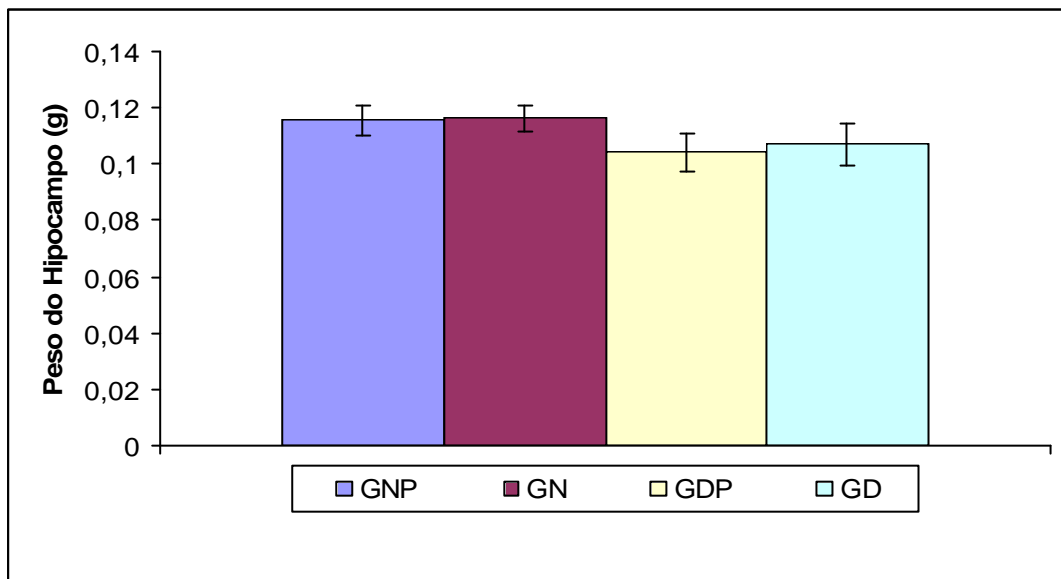


Figura 6: Efeito da restrição de alimentos sobre o peso do hipocampo dos ratos. Os grupos GNP e GN, que representam o grupo de animais normonutridos, foram alimentados *ad libitum*. Já os grupos GDP e GD, que representam o grupo de animais desnutridos, receberam 60% da dieta ingerida pelos animais normonutridos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos. As barras representam o EPM (erro padrão da média).

4.4- ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DO BROTAMENTO AXONAL

A análise densitométrica foi realizada aos 120 dias de idade dos ratos, utilizando-se a técnica de marcação histoquímica de Neo-Timm.

Todos os animais que sofreram SE, tanto o grupo normonutrido quanto o grupo desnutrido, apresentaram brotamento na camada molecular interna do hilo do giro denteado. Nem o grupo normonutrido controle, ou o grupo desnutrido controle, que não sofreram SE, apresentaram brotamento (Fig. 7).

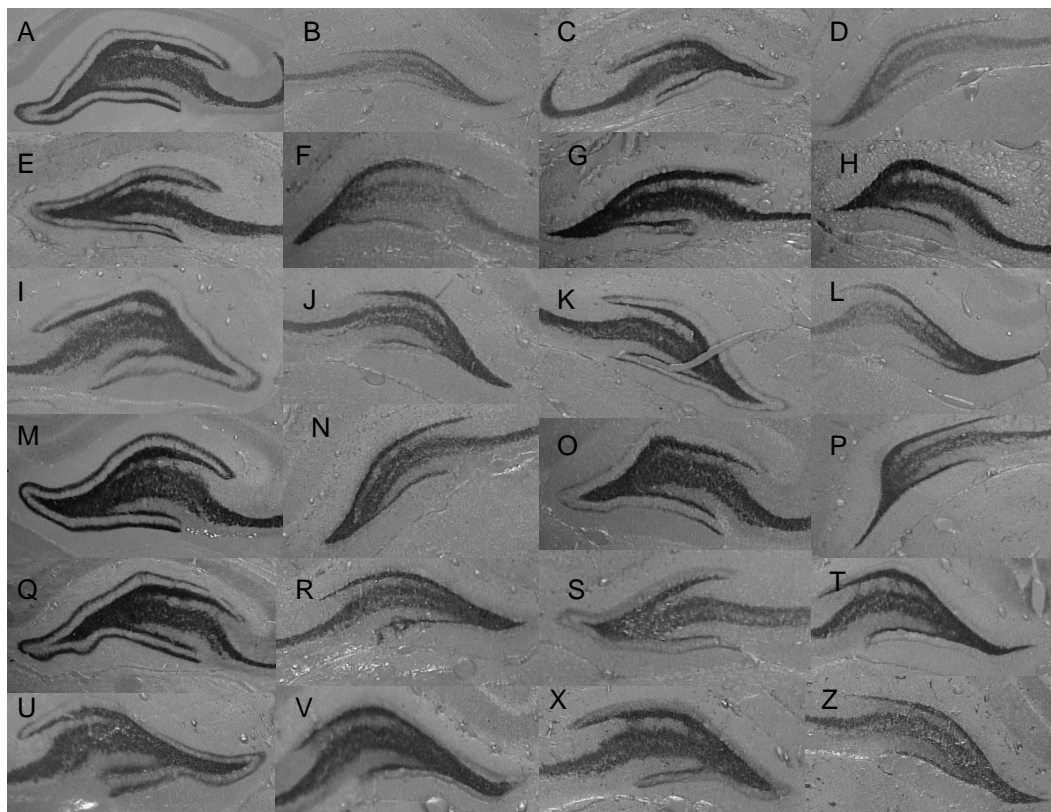


Figura 7. Painéis A, E, I, M, Q, U, são imagens do grupo normonutrido induzido ao SE pela pilocarpina; B, F, J, N, R, V, são imagens do grupo normonutrido controle; C, G, K, O, S, X, são imagens do grupo desnutrido induzido ao SE pela pilocarpina; D, H, L, P, T, Z, são imagens do grupo desnutrido controle. As imagens alinhadas horizontalmente foram processadas em conjunto, contendo um representante de cada grupo experimental.

Na análise quantitativa do brotamento, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos normonutrido induzido ao SE pela pilocarpina e o grupo desnutrido induzido ao SE pela pilocarpina, onde o grupo GDP apresentou uma marcação 36% menor que o grupo GNP. Também foi observada diferença estatisticamente significativa destes dois grupos em relação aos grupos normonutrido e desnutrido sem a indução ao SE pela pilocarpina, que apresentaram uma taxa de marcação próxima a zero, indicando a ausência de brotamento. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, normonutrido e desnutridos, sem indução ao SE pela pilocarpina. Fig. 8.

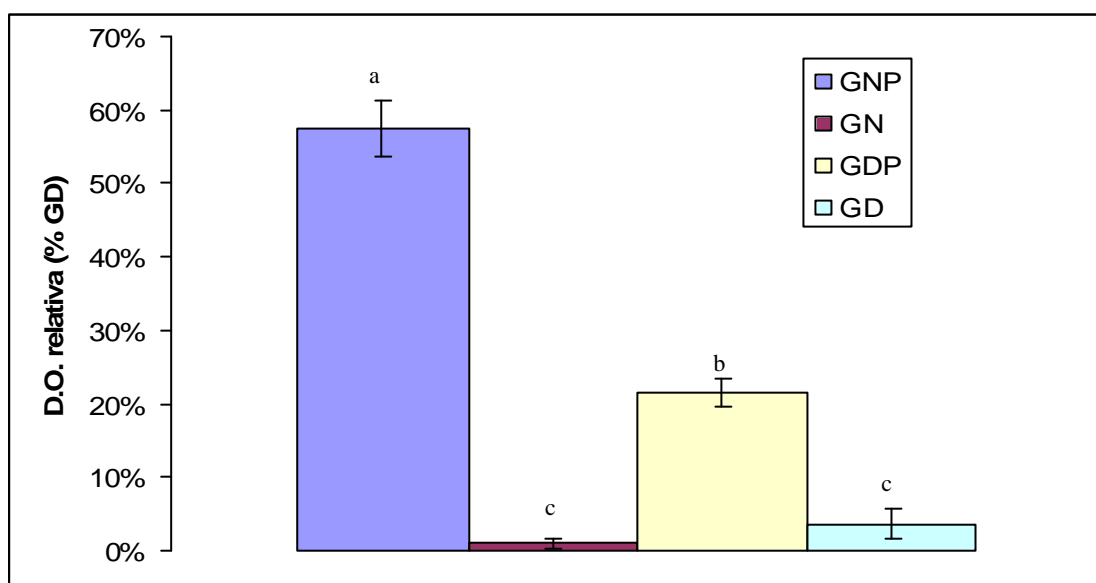


Fig. 8. Níveis de cinza médios na região supragranular do giro denteado em relação aos níveis de cinza médios do giro denteado no hipocampo dos animais GNP (grupo normonutrido induzido ao SE pela pilocarpina), GN (grupo normonutrido controle), GDP (grupo desnutrido induzido ao SE pela pilocarpina) e GD (grupo desnutrido controle). Letras sobrescritas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

4.5- O EFEITO DA RESTRIÇÃO DE ALIMENTOS SOBRE O CONTEÚDO DE PROTEÍNA E DNA NO HIPOCAMPO

As Figuras 9 e 10 apresentam, respectivamente, os resultados dos conteúdos médios de proteína e DNA do hipocampo dos quatro grupos experimentais estudados. Os resultados, expressos em mg de proteína por g de tecido e mg de DNA por g de tecido, foram semelhantes nos grupos desnutridos e controles com e sem indução ao SE pela pilocarpina. As quantidades de proteína apresentaram valores muito próximos, em torno de 70 mg/g de tecido, observando-se que não houve diferença estatisticamente significativa. Os teores de DNA também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

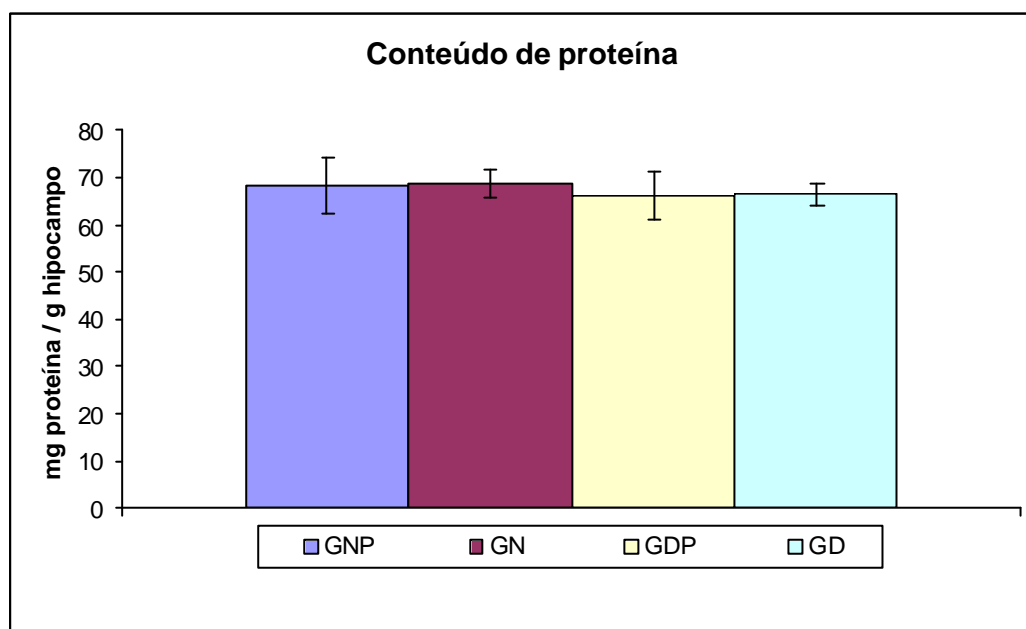


Figura 9. Conteúdo de proteínas do hipocampo dos animais GNP (grupo normonutrido induzido ao SE pela pilocarpina), GN (grupo normonutrido controle), GDP (grupo desnutrido induzido ao SE pela pilocarpina) e GD (grupo desnutrido controle) ao sacrifício. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos. As barras representam o EPM (erro padrão da média).

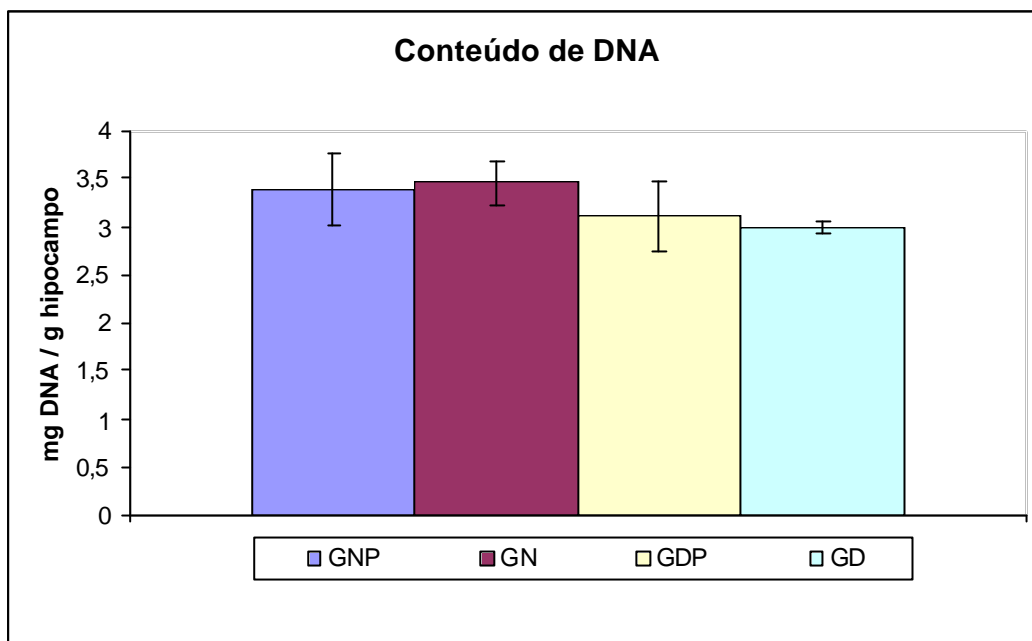


Figura 10. Conteúdo de DNA do hipocampo dos animais GNP (grupo normonutrido induzido ao SE pela pilocarpina), GN (grupo normonutrido controle), GDP (grupo desnutrido induzido ao SE pela pilocarpina) e GD (grupo desnutrido controle) ao sacrifício. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos. As barras representam o EPM (erro padrão da média).

4.6- LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO ESTIMULADA POR K⁺

Os resultados dos conteúdos de glutamato liberados de fatias de hipocampo, em condições basais e estimuladas por KCl, podem ser vistos na figura 11. A quantidade de GLU liberado em condições basais foi semelhante para todos os grupos estudados. A indução do *status epilepticus* pela pilocarpina promoveu maior liberação de glutamato no grupo normonutrido, mas não houve diferença nos ratos desnutridos. A desnutrição não alterou a liberação de glutamato, estimulada por K⁺, que foi menor do que a liberada em animais normonutridos em *status epilepticus*, em aproximadamente 28% (P<0,05).

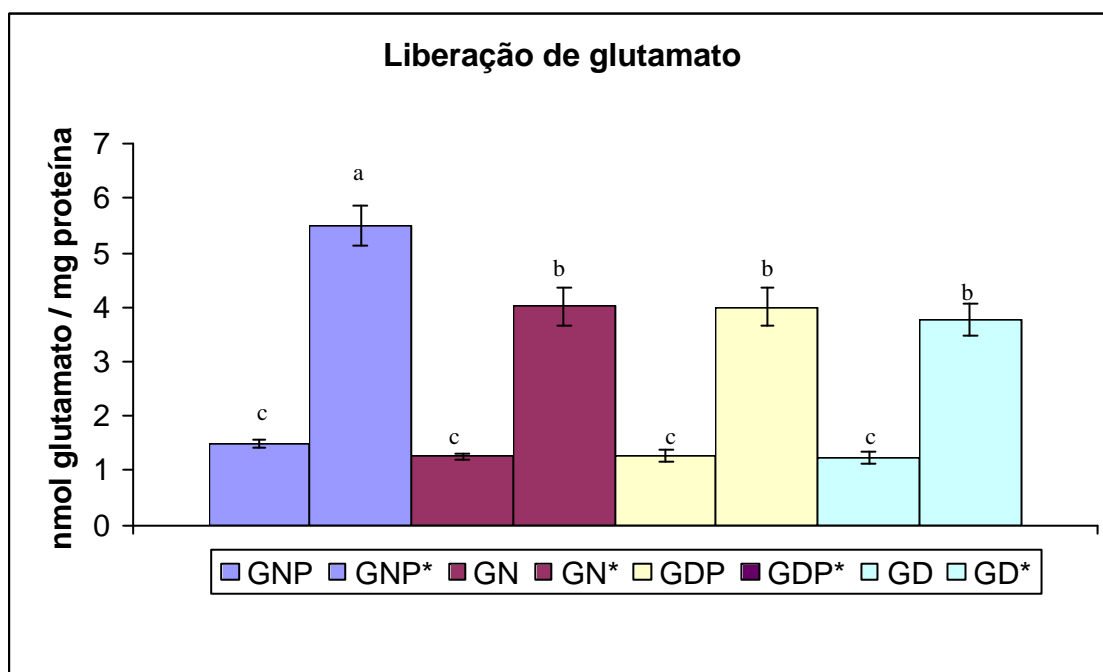


Figura 11. Liberação de Glutamato (nmol/mg proteína) de fatias de hipocampo dos animais GNP (grupo normonutrido induzido ao SE pela pilocarpina) GNP* (GNP estimulado por K⁺), GN (grupo normonutrido) GN* (GN estimulado por K⁺), GDP (grupo desnutrido induzido ao SE pela pilocarpina) GDP* (GDP estimulado por K⁺), GD (grupo desnutrido), GD* (GD estimulada por K⁺). Fatias de hipocampo (50 mg) foram incubadas por 15 minutos a 37°C em meio de Krebs-Ringer-Hepes (KRH), contendo a concentração de 40mM de KCl como estímulo. Para avaliar a liberação de Glutamato basal foi realizado o mesmo procedimento citado acima, no entanto a concentração de KCl era do meio de KRH (4,8mM). As letras sobrescritas distintas, indicam diferenças estatisticamente significativas, pelo teste de Duncan (P< 0,05). Os resultados são expressos como média ± EPM.

4.7- LATÊNCIA PARA O INÍCIO DAS CRISES RECORRENTES ESPONTÂNEAS.

A latência para o início das crises recorrentes espontâneas dos animais GNP e GDP podem ser vistos na figura 12. Os grupos GNP e GDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

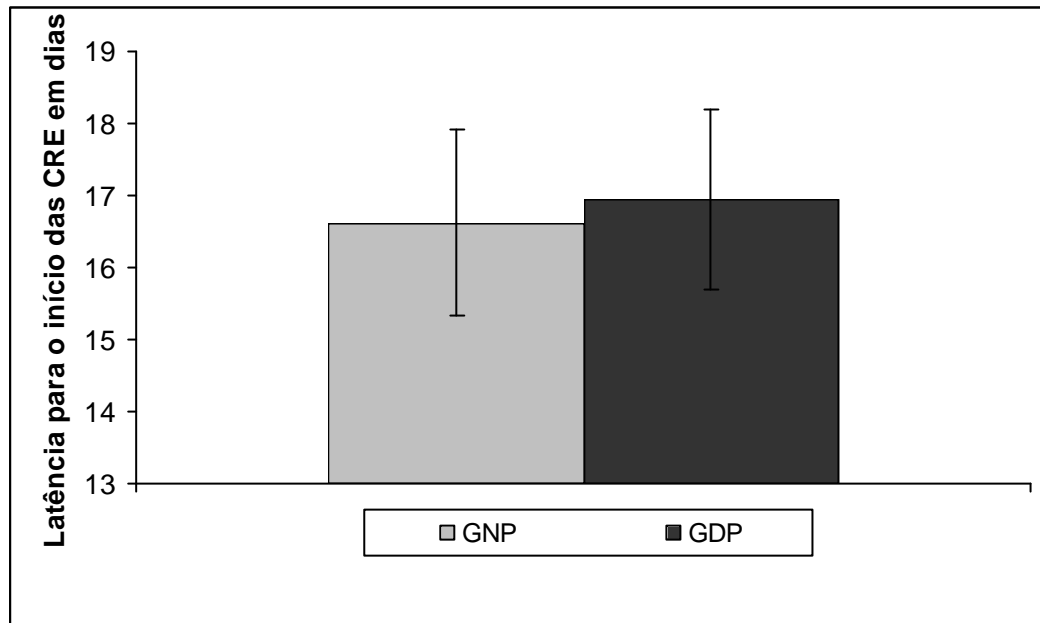


Figura 12. Latência para o início das crises recorrentes espontâneas no grupo de animais GNP (grupo normonutrido induzido ao SE pela pilocarpina) e GDP (grupo desnutrido induzido ao SE pela pilocarpina). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos GNP e GDP. As barras representam o EPM (erro padrão da média).

4.8- NÚMERO DE CRISES RECORRENTES ESPONTÂNEAS DURANTE UM PERÍODO DE 6 HORAS POR DIA.

O número de episódios de crises recorrentes espontâneas dos animais estudados, em um período de registro de 6 horas, pode ser visto na figura 13. Os grupos normonutridos se desnutridos que sofreram *status epilepticus* não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

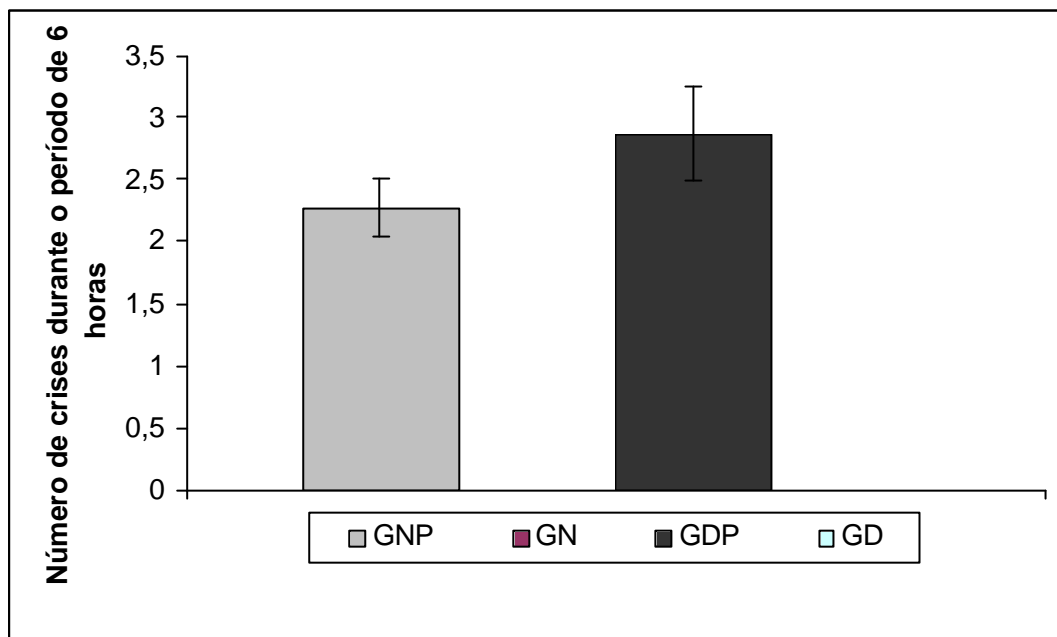


Figura 13. Quantidade de crises recorrentes espontâneas, em um período de registro de 6 horas dos animais GNP (grupo normonutrido induzido ao SE pela pilocarpina), GN (grupo normonutrido controle), GDP (grupo desnutrido induzido ao SE pela pilocarpina) e GD (grupo desnutrido controle) em um período de registro de 6 horas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos GNP e GDP. As barras representam o EPM (erro padrão da média).

4.9- TEMPO MÉDIO DE DURAÇÃO DAS CRISES RECORRENTES ESPONTÂNEAS

O tempo médio de duração das CRE dos animais GNP e GDP pode ser visto na figura 14. O tempo médio de crise dos animais do grupo GDP foi 14,48% menor em relação ao grupo GNP ($P < 0,05$).

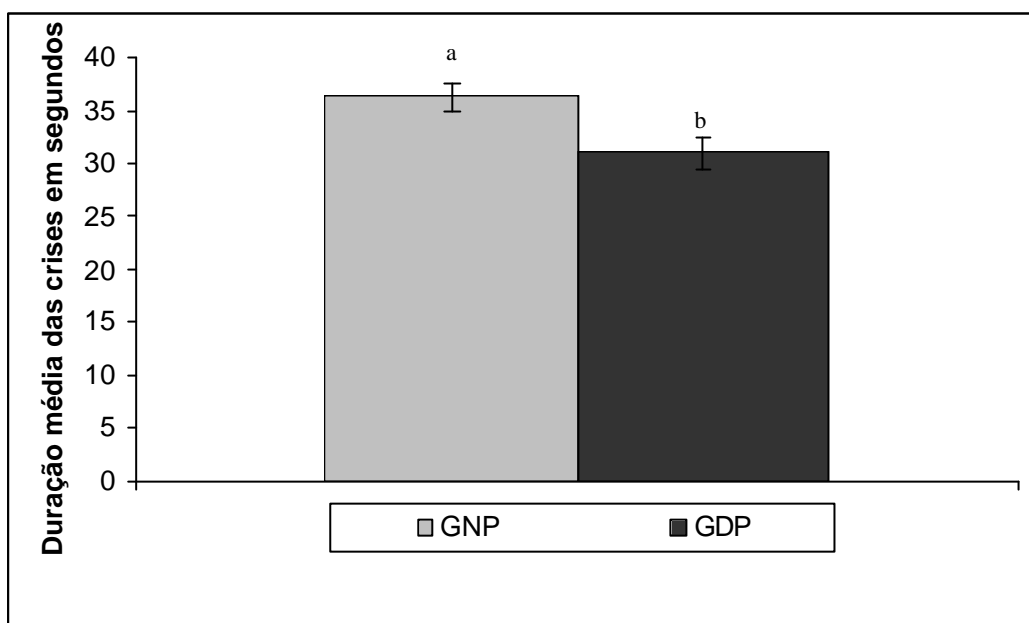


Figura 14. Tempo médio de duração das CRE dos animais GNP (grupo normonutrido induzido ao SE pela pilocarpina) e GDP (grupo desnutrido induzido ao SE pela pilocarpina). As letras sobrescritas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Os resultados são expressos como média \pm EPM.

4.10- TEMPO MÉDIO DE DURAÇÃO DE REGISTRO-EEG EPILEPTIFORME DURANTE AS CRISES RECORRENTES ESPONTÂNEAS

O tempo médio de duração de registro-EEG epileptiforme durante as CRE dos animais GNP e GDP pode ser visto na figura 15. O tempo médio de duração de registro-EEG dos grupos GNP e GDP não apresentou diferença estatisticamente significativa.

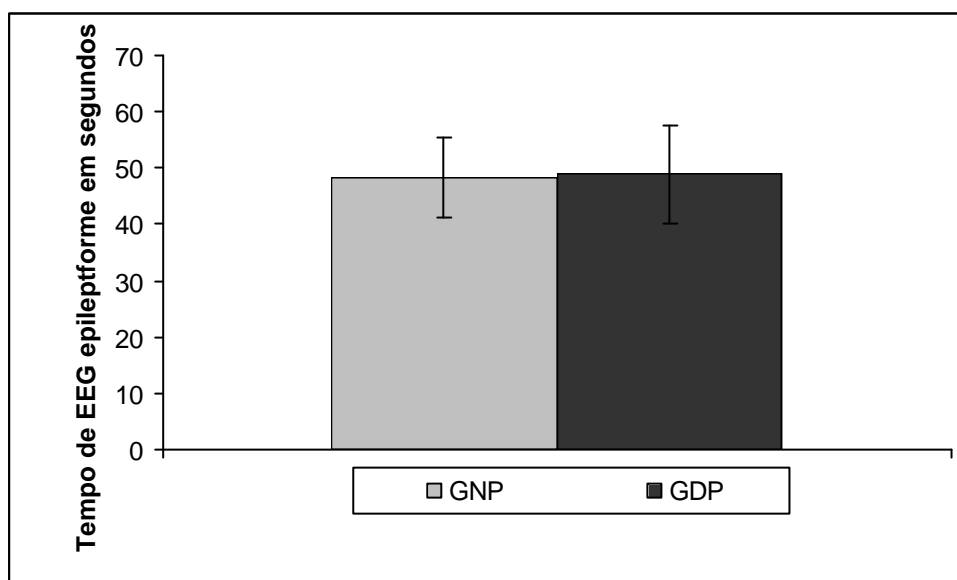


Figura 15. Tempo médio de duração de EEG epileptiforme durante as CRE dos animais GNP (grupo normonutrido induzido ao SE pela pilocarpina) e GDP (grupo desnutrido induzido ao SE pela pilocarpina). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos GNP e GDP. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

As figuras 16 e 17 representam registros eletroencefalográficos (EEG) típicos encontrados durante uma crise recorrente espontânea. O segmento do registro mostrado abaixo abrange um período de EEG basal, período pré-crise com a presença de complexos K que é comum antes da crise espontânea, período inicial da crise, mostrando uma ativação inicial da amígdala e início do EEG epileptiforme no hipocampo e córtex com posterior recrutamento da amígdala e aumento na amplitude e frequência dos disparos epileptiformes, finalmente um período onde ocorre o espaçamento das ondas lentas e depressão do EEG basal, caracterizando o final da crise espontânea.

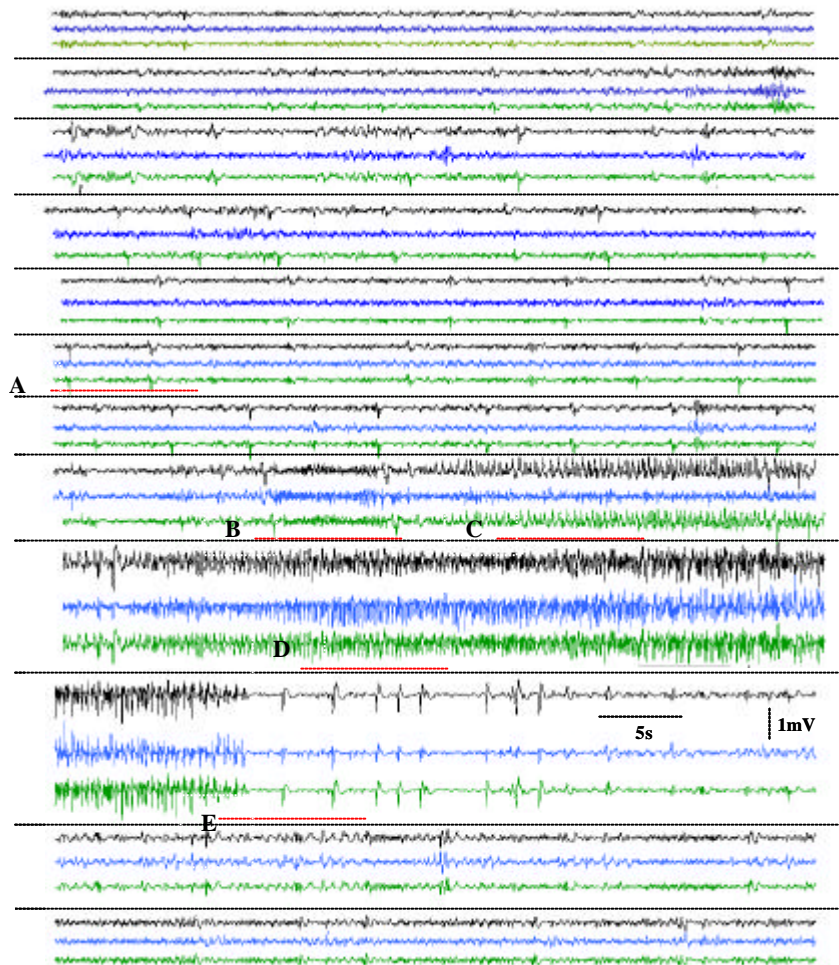


Figura 16. Registro encefalográfico típico de crises recorrentes espontâneas provocadas pelo status epilepticus por injeção de pilocarpina. O tempo de registro foi de 480 segundos, mostrados em intervalos de 40 segundos em cada linha, sendo que o do canal 1 (córtex) está representado em cor preta, o do canal 2 (amígdala) está representado em cor azul, o do canal 3 (hipocampo dorsal) está representado em cor verde. As barras vermelhas indicam períodos de registros que estão amplificados na figura 17.

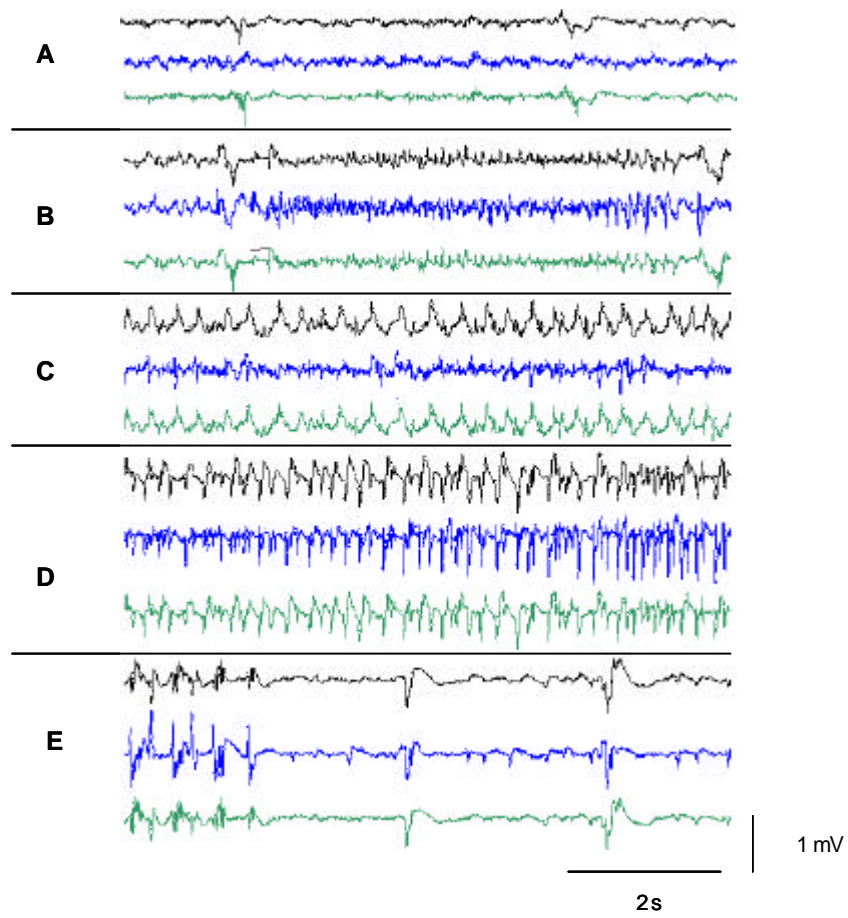


Fig. 17. Segmentos do eletroencefalograma representado na figura 16, em escala ampliada, nos períodos correspondentes a uma crise típica nas diferentes regiões do cérebro.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

De acordo com nosso desenho experimental, a restrição de alimentos imposta às mães de 1 a 3 dias antes do parto, promove uma diminuição na quantidade de leite produzida a partir do 1º dia de lactação sem, no entanto, afetar o desenvolvimento pré-natal, refletida por perda de peso corporal ao nascimento ou por morte nos grupos. A restrição de alimentos imposta aos animais foi efetiva em promover a desnutrição, quando avaliada pelo ganho de peso, sendo possível detectar uma menor massa corporal no grupo de animais desnutridos já na primeira semana.

O modelo de restrição alimentar pós-natal, imposta aos animais durante período crítico de rápido crescimento e desenvolvimento encefálico, foi efetivo o suficiente para verificar alterações neurofisiológicas provocadas pela desnutrição. O modelo de restrição adotado permite ainda extrapolações para o ser humano, considerando a semelhança com o que ocorre em encéfalo de crianças desnutridas na infância, com ou sem reabilitação nutricional após o período crítico de crescimento e desenvolvimento humano (DOBBING & SANDS, 1979).

O encéfalo, apesar de ser protegido em detrimento de outras estruturas, como as vísceras, quando este está sob um insulto nutricional (HALES & BARKER, 1992), à semelhança do efeito sobre o peso corporal dos animais, apresentou diminuição do peso encefálico ocasionada pela restrição de alimentos pós-natal, no entanto este efeito adverso foi apresentado em menor proporção. Assim como o peso corporal, estes dados estão de acordo com a literatura (WINICK & NOBLE, 1966; SANTOS & MORAES-SANTOS, 1979; PEDROSA & MORAES-SANTOS, 1987; ROCINHOLI *et al.*, 1997; OLIVEIRA, 1998).

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação ao teor de proteína e DNA no hipocampo dos quatro grupos experimentais, confirmando os dados de HAMMER *et al.*, 1980 e VILLESAS *et al.*, 1980. Isto significa que o tamanho e o número de células mantiveram-se inalterados por ação da desnutrição, quando avaliada aos 120 dias de vida.

O brotamento das fibras musgosas das células granulares foi diminuído pelo insulto nutricional imposto, evidenciando uma neuroplasticidade restrita ou menos eficiente, já que foi detectada menor densidade de brotamento das fibras musgosas das células granulares no grupo de animais desnutridos, submetidos ao *status epilepticus* provocado por injeção sistêmica de pilocarpina, em comparação ao grupo de animais normonutridos, submetidos ao mesmo tratamento. Da mesma maneira, o

insulto nutricional impediu o aumento da liberação de glutamato estimulada por KCl 40 mM no grupo de animais desnutridos submetidos ao SE, indicando um impedimento plasticidade em resposta ao SE. No entanto, foi encontrado um aumento na liberação de glutamato estimulada por KCl 40 mM no grupo de animais normonutridos submetidos ao SE, o que está de acordo com a literatura (CAVALHEIRO, 1994; MARICILIA *et al.*, 2004). Já a liberação de glutamato estimulada por KCl 40 mM nos grupos de animais normonutridos e desnutridos sem indução ao SE não apresentaram diferença, o que está de acordo com (ROTTA *et al.*, 2003). Por outro lado, neste mesmo trabalho, ROTTA e colaboradores (2003) encontraram uma diminuição na liberação de glutamato basal provocada pela desnutrição, o que não foi comprovado por nosso trabalho, já que não foi observada diferença estatística entre a liberação de glutamato basal dos quatro grupos, embora observamos uma tendência no aumento da liberação de glutamato basal no grupo normonutrido submetido ao SE, confirmando os resultados de (MARICILIA *et al.*, 2004).

Tais achados, provavelmente estão relacionados à menor taxa de biossíntese de proteínas encontrada em animais desnutridos (MORAES-SANTOS, 1981; SANTOS & MORAES-SANTOS, 1979; PEDROSA & MORAES-SANTOS, 1987), uma vez que estão diretamente relacionadas à síntese de proteínas as manifestações de neuroplasticidade, no SNC adulto, como: alteração da função dendrítica, reestruturação sináptica, brotamento axonal, extensão do neurônio, sinaptogênese e neurogênese.

O brotamento das fibras musgosas é um achado comum em animais que apresentam crises recorrentes espontâneas (DUDEK *et al.*, 1994). De acordo com (LEMONS & CAVALHEIRO, 1995) a frequência de crises recorrentes espontâneas aumenta se a intensidade de brotamento é elevada. No entanto, o impedimento causado pela desnutrição no brotamento das fibras musgosas das células granulares e na liberação de glutamato, estimulada por KCl, não foi efetivo em evitar o aparecimento das crises recorrentes espontâneas e nem em diminuir a frequência das mesmas. Apesar de encontrarmos um menor tempo de duração das crises recorrentes espontâneas, não houve diferença no tempo de duração de disparo epileptiforme no registro eletroencefalográfico entre os grupos normonutridos e desnutridos que sofreram SE. No entanto, houve uma tendência de aumento do número de episódios de CRE no grupo de animais desnutridos submetidos ao SE por injeção sistêmica de pilocarpina. Estes resultados sugerem que o aparecimento de crises recorrentes espontâneas no modelo experimental de epilepsia de lobo temporal ocorre em paralelo com o brotamento das fibras musgosas das células granulares, mas o brotamento não

está ligado diretamente com a gênese das mesmas, o que está de acordo com a literatura.

Corroborando com este pensamento, SUTULA *et al.* (1989) e MATHERN *et al.* (1996^a) não observaram associação entre duração da epilepsia e a densidade das fibras musgosas. Da mesma forma, MELLO *et al.* (1993) mostraram ausência de correlação entre a frequência de crise e o brotamento das fibras musgosas porque a densidade de brotamento não está associada com o número total de crises espontâneas em humanos com epilepsia de lobo temporal ou animais experimentais (PITKANEM *et al.*, 2000). Assim como o bloqueio do brotamento das fibras musgosas com ciclo-hexamida (forte inibidor de síntese protéica) não impede o aparecimento das crises espontâneas, tanto no modelo de injeção sistêmica de pilocarpina quanto no modelo de injeção intra-hipocampal de ácido caínico (LONGO & MELLO, 1997).

Segundo PHILIP *et al.* (2002), o tratamento prévio com ciclo-heximida nos ratos induzidos ao *status epilepticus* por injeção sistêmica de pilocarpina não evita o brotamento das fibras musgosas das células granulares nem perda de neurônios nas regiões CA1 ou CA3 do hilo, quando avaliados por marcação histoquímica pelo método de Timm. Mas o desenvolvimento de crises espontâneas recorrentes pode ocorrer mesmo sem a perda neuronal no hipocampo ou o brotamento das fibras musgosas, o que está de acordo com o presente estudo.

No entanto, ao contrário da utilização de ciclo-hexamida como inibidor de síntese de proteínas no modelo de epilepsia lobo temporal, por indução ao SE via injeção sistêmica de pilocarpina, o insulto nutricional parece ter promovido adaptação fisiológica, na qual uma menor biossíntese de proteínas, inclusive em animais recuperados nutricionalmente (PEDROSA & MORAES-SANTOS, 1987), foi suficiente para diminuir o brotamento axonal, mas não reduziu a indução do SE nem aumentou a mortalidade dos ratos tratados com injeção sistêmica de pilocarpina. É possível que o uso da ciclo-heximida na inibição da biossíntese de proteínas cause outros efeitos adversos, relevantes para o funcionamento do sistema nervoso central, dificultando assim a aplicação do modelo de epilepsia de lobo temporal, via injeção sistêmica de pilocarpina na indução ao SE.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A restrição de alimentos imposta aos animais foi efetiva em promover a desnutrição a partir do 7º dia de vida, quando avaliada pelo ganho de peso corporal e promoveu diminuição do peso encefálico, ao sacrifício, no entanto este efeito foi encontrado em menor proporção. O presente estudo indica que o brotamento das fibras musgosas das células granulares e o aumento na liberação de glutamato, estimulada por K^+ , provocado pelo *status epilepticus* (SE) induzido pela pilocarpina, foram inibidos pela desnutrição neonatal, provavelmente relacionada à diminuição da síntese de proteínas, inibindo a plasticidade do SNC em resposta ao SE. No entanto, não foram observadas alterações significativas em relação às crises recorrentes espontâneas (CRE), indicando que o brotamento das fibras musgosas das células granulares ocorre em paralelo ao desenvolvimento das CRE, mas parece não ser a causa delas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, S.; FONTANA, A. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* 41: 313-318, 2002.
- ANDERSON, C.M; SWANSOS, R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions. *Glia.*, 32: 1-14, 2000.
- BAYER, S.C.; ALTMAN, J. Hippocampal development in the rat, *J. Comp. Neurol.*,158; 55-80, 1974 .
- BEDI, K.S.; THOMAS, Y.M.; DAVIS, C.A.; DOBBING, J. Synapse to neuron ratios of the frontal and cerebellar cortex of 30-day-old and adult rats undernourished during early postnatal life. *J.Comp.Neurol.*, 193: 49-56, 1980.
- BORGES, Prevalência urbana da epilepsia: estudo populacional em São José do Rio Preto, Brasil. Tese de Doutorado, Faculdade de medicina de São José do Rio Preto, 2002.
- BRONZINO, J.D.; AUSTIN-LAFRANCE, R.J.; MOKLER, D.J.; MORGANE, P.J. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampus long-term potentiation in freely moving rats. *Exp. Neurol.*, 148:317-323, 1997.
- BRONZINO, J.D.; AUSTIN-LAFRANCE, R.J.; SIOK, C.J.; MORGANE, P.J. Effect of protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioural measures. *Brain. Res.*, 384(2):348-54, 1986.
- BROWN, J.L.; POLLITT,E. Malnutrition, poverty and intellectual development. *Scientific American*, 274: 2, 1996.
- BUGGY, D.J.; NICOL, B.; ROWBOTHAM, D.J.; LAMBERT, D.G. Effects of intravenous anesthetic agent on glutamate release: A role for GABA_A receptor-mediated inhibition. *Anesthesiology*, 92: 1067-1073, 2000.
- CAVALHEIRO, E.A. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital. J. Neurol. Sci.*16: 33-37, 1994.
- CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 460S-463S, 1997.
- CHAPMAN, A. Glutamate and epilepsy. *J. Nutr.* 130: 1043S-1045S, 2000.
- CONTI, F.; MINELLI, A.; DEBIASE, S.; MELONE, M. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Mol. Neurobiol.* 14: 1-18, 1997.
- COSTA, M.S.; ROCHA, J.B.T.; PEROSA, S.R.; CAVALHEIRO, E.A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Pilocarpine-induced *status epilepticus* increases glutamate release in rat hippocampal synaptosomes. *Neurosci. Let.* 356: 41-44, 2004.

- COTMAN, C.W.; KAHLE, J.S.; MILLER, S.E.; ULAS, J.; BRIDGES, R.J. Excitatory amino acid neurotransmission. *Psychopharmacol.* 7: 75-85, 1995.
- DAIKHIN, Y.; YUDKOFF, M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J. Nutr.* 130: 1026S-1031S, 2000.
- DALBOLT, N.C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65: 1-105, 2001.
- DINGLELINE, R.; McBAIN, C.J. Excitatory aminoacid transmitters. In: SIEGEL, G.J. et al. (Ed.) *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, 5ed. New York: Raven Press, 1994.
- DOBBING, J.; SANDS, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Dev.*, 3: 79-83, 1979.
- DRESCHER, R.J.; DRESCHER, D.G. Glutamate of the endogenous primary alphanino acids, is specifically released from hair cells by elevated extracellular potassium. *J. Neurochem.* 59: 93-98, 1992.
- DYSON, S.E.; JONES, D.G. Some effects of undernutrition on synaptic development – a quantitative ultrastructural study. *Brain Res.*, 114: 356-378, 1976.
- EDMONDS, B.; GIBB, A.J.; COLQUHOUN, D. Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 495-519, 1995.
- ENGEL, J. Concepts of epilepsy. *Epilepsia.*, 36: 23-29, 1995
- ERECINSKA, M.; SILVER, I.A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progress Neurobiol.* 35: 245-296, 1990.
- EYBALIN, M. PUJOL, R. Choline acetyltransferase (CHAT) immunoelectron microscopy distinguishes at least three types of efferent synapses in the organ of Corti. *Exp. Brain Res.*, 65: 261-270, 1987.
- EYBALIN, M. Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev.*, 73: 309-373, 1993.
- FAINGOLD, C.L.; TRAVIS, M.A.; GEHLBACH, G.; HOFFMANN, W.E.; JOBE, P.C.; LAIRD, H.E. 2nd; CASPARY, D.M. Neuronal response abnormalities in the inferior colliculus of the genetically epilepsy-prone rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 63(3): 296-305, 1986.
- FISHER, R.S. Animal models of the epilepsies. *Brain Research Review*, 14(3): 245-278, 1989.
- GALLO, V.; GHIANI, C.A. Glutamate receptors in glia: new inputs and new functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 252-258, 2000.

- GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETO, M.C.; PRADO, R.P.; JORGE, B.P.; TERRA, V.C.; OLIVEIRA, J.A. Evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods. *Behav. Brain Res.* 48(1): 49-56, 1992.
- GARCIA-CAIRASCO, N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hearing Research*, 168: 208-222, 2002).
- GODDARD, G.V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature.*, 214: 1020-1021, 1967.
- GOMES-PIMENTEL, F. *Curso de estatística experimental*. 13. ed. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, 1990. 467 p, 1990.
- GONÇALVES, L.A.; *Efeito da restrição alimentar e do envelhecimento sobre o sistema colinérgico cortical de ratos*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2001. 84p. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- GRANADOS-ROJAS, L.; LARRIVA-SAHM, J.; CINTRA, L.; GUTIÉRREZ-OSPINA, G.; RONDÁN, A.; DÍAZ-CINTRA, S. Prenatal protein malnutrition decreases mossy fibers-CA3 thorny excrescence asymmetrical synapses in adult rats. *Brain Res.*, 933: 164-171, 2002.
- HACKET, R.J.; HACKET, L.; BHAKTA, P. the prevalence and associated factors of epilepsy in children in Calicut District, Kelara, India. *Acta Paediatrica* 86: 1257-1260, 1997.
- HACKETT, R.; IYPE, T. Malnutrition and childhood epilepsy in developing countries. *Seizure.*, 10: 554-558, 2001.
- HALES, C.N.; BARKER, D.J.P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 35: 595-601, 1992.
- HAMMER, R.P.; MATHERNS, E.V. Morphological development of the brain stem reticular core in prenatally undernourished rats. *Devel. Brain Res.*, 1: 203-212, 1980.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48: 422-427, 1972.
- HEBB, D.O. *The Organization of Behavior*. John Wiley and Sons. 1949. New York. Ref. Type: Serial (Book, Monograph).
- HERTZ, L.; PENG, L. Energy metabolism at the cellular level of the CNS. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 70: S145-S157, 1992.

- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H; Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in the other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 68: 285-316, 1997.
- KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T.M. Principles of Neural Science. McGraw-Hill. 4thed., 1-1414. 1991
Ref. Type: Serial (Book, Monograph).
- KATZ, H.B.; DAVIES, C. The effects of early-life undernutrition and subsequent environment on morphological parameters of the rat brain. *Behav. Brain Res.*, 5: 53-64, 1981.
- KAWAI, S.; NAKAMURA, H.; MATSUO, T. Effects of early postnatal undernutrition on brainstem auditory potentials in weaning rats. *Biol. Neonate.*, 55: 268-274, 1989.
- KITAYAMA, M.; HIROTA, K.; KUDO, M.; KUDO, T.; ISHIHARA, H.; MATSUKI, A. Inhibitory effects of intravenous anesthetic agents on K⁺-evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. Involvement of voltage-sensitive Ca²⁺ channels and GABA_A receptors. *Arch. Pharmacol.* 366: 246-253, 2002.
- LAJTHA, A.; DUNLOP, D.; PATLAK, C.; TOTH, J. Compartments of protein metabolism in developing brain. *Biochimica et Biophysica Acta.* 561: 491-501, 1979.
- LEITE J.P.; BORTOLOTTO Z.A.; CAVALHEIRO E.A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosc. Biobehav. Ver.* 14: 511-517, 1990.
- LEMOES T.; CAVALHEIRO E.A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res.*, 102: 423-8, 1995.
- LONGO, B.M.; MELLO, L.E. Blockade of pilocarpine- or -Kainate-induced mossy fiber sprouting by cycloheximide does not prevent subsequent epileptogenesis in rats. *Neuroscience Letters.* 226: 163-166, 1997.
- LORENT DE NÓ, R. Studies on the Structure of the Cerebral Cortex. II Continuation of the Study of the Ammonic system. *Journal f. Psychologie und Neurologie*, 46: 113-177, 1934.
- LÖSCHER, W.; Animal Models of Intractable Epilepsy. *Progress in neurobiology* 53: 239-258, 1997.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- MAGISTRETTI, P.J. ; PELERIN, L.; ROTHMANN, D.L.; SCHULMAN, R.G. Energy on demand. *Science* 283: 496-497, 1999.

- MARTHERN, G.W.; BABB, T.L.; MISCHER, P.S.; VINTERS, H.V.; PRETORIUS, J.K.; LEITE, J.P.; PEACOCK, W.J. childhood generalized and mesial temporal epilepsies demonstrate different amounts and patterns of hippocampal neuron loss and mossy fiber synaptic reorganization. *Brain*, 119: 965-87, 1996.
- MASSENSINI, A.R. Estudo comparativo dos efeitos da Tityustoxina e da Toxina-gama sobre o Sistema Nervoso Central de ratos. Tese de Mestrado, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, 1996.
- MCDONALD, J.W.; JOHNSTON, M.V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15: 41-70, 1990.
- MCNAMARA J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J. neuroscience*, 14(6): 3413-25, 1994.
- MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology. *J. Nutr.* 130: 1007S-10015S, 2000.
- MELLO, L.E.; LONGO, B.M. Eletrofisiologic Abnormalities of Hippocampus in the Pilocarpine/Cicloheximide Model of Chronic Spontaneous Seizures. *Epilepsia*, 43: 203-208, 2002.
- MELLO, L.E.; CAVALHEIRO E.A.; TAN A.M.; KUPFER W.R.; PRETORIUS J.K.; BABB T.L.; FINCH D.M. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, 34: 985-995, 1993.
- MESULAM, M.M. Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles, *Neuron*, 24: 521-529, 1999.
- MILLAN, M.H.; CHAPMAN, A.G.; MELDRUM, B.S. Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Res.* 14: 139-148, 1993.
- MILNER, B.; SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R.; Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20: 445-468, 1998.
- MODY, I.; MACDONALD, J.F. NMDA receptor-dependent excitatory: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 356-359, 1995.
- MORAES, M.F.D.; VECCHIO, F.D.; TERRA, V.C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Time evolution of acoustic information processing in the mesencephalon of wistar rats. *Neuroscience Letters*, 284: 13-16, 2000.
- MORAES-SANTOS, T. Dietary effects in vitro rat neuronal protein synthesis during growth and development. *Brain Res. Bull.*, 7: 385-389, 1981.

- 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.; MILLER, M.; STERN, W.; HALL, R.; BRONZINO, J.; KISSANE, J.; HAWRELEWICZ, E; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition and the developing central nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2: 137-230, 1978.
- MORGANE, P.J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav. Rev.*, 26: 471-483, 2002
- MOUREK, J.; HIMWICH, A.W.; MYSLIVECEK, J.; CALLISON, D.A. The role nutrition in the development of evoked cortical responses in rat. *Brain Res.*, 6: 241-251, 1967.
- NAITO, S.; UEDA, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 44: 99-109, 1985.
- NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A.,J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 748-755, 2002.
- NICHOLLS, D.G. The glutamatergic nerve terminal. *Eur. J. Biochem.*, 272: 613-631, 1993.
- NUNES, M.L; BATISTA, B.B; MICHELI, F.; BATISTELLA, V. Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats. *J. Pediatr.*, 78: 39-44, 2002
- OLIVEIRA, A.L.G. *Efeito da restrição alimentar e do envelhecimento sobre o sistema nervoso central glutamatérgico e o compartimento fagocítico do sistema imune: um modelo experimental para o estudo da nutrição de idosos*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 1998. 97p. (Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos).
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUKUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 54: 581-618, 1998.
- PAXINOS, G.; WATSON, CH. The rat brain stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney, 1986.
- PEDROSA, M.L.; MORAES-SANTOS, T. Neuronal protein biosynthesis by neonatally malnourished and nutritionally recovered rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 20: 331-338, 1987.
- PHILIP A. W.; JEAN-PIERRE W.; PING D.; DAMIEN J.; FERRARO, F.; DUDEK E. Reassessment of the Effects of Cycloheximide on Mossy Fiber Sprouting and Epileptogenesis in the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *J.Neurophysiol.*, 88: 2075-2087, 2002.

- PIERSON, M.G.; SWANN, J. Ontogenetic Features of Audiogenic Seizure Susceptibility Included in Immature Rats by Noise. *Epilepsia* 32(1): 1-9, 1991.
- PIERSON, M.; SMITH, K.; SWANN, J. Slow NMDA-mediated potential underlies seizures originating from midbrain. *Brain Res.* 486: 381-6, 1989.
- PITKANEN, A.; NISSINEN, J.; LUKASIUK, K.; JUTILA, L.; PALJARVI, L.; SALMENPERA, T.; KARKOLA, K.; VALPALAHTI, M.; YLINEN, A. Association between the density of mossy fiber sprouting and seizures frequency in experimental human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 41(Suppl 6): S24-9, 2000.
- PLANTZ, G.R.; WILLISTON, J.S.; JEWETT, D.L. Effects of undernutrition on development of far-field auditory brain stem response in rat pups. *Brain Res.*, 213: 319-326, 1981.
- PRASAD, A.S.; DUMOUCHELLE, E.; KONIUCH, D.; OBERLEAS, D. A simple fluorometric assay for the determination of RNA and DNA in tissues. *J. Lab. Clin. Med.*, 80: 598 – 601, 1972.
- QUIRK, G.J.; MEJIA, W.R.; HESSE, H. SU, H. Early malnutrition followed by nutritional restoration lowers the conduction velocity and excitability of the corticospinal tract. *Brain Res.*, 670: 277-282, 1995.
- REPRESA, A.; NIQUET J.; POLLARD H.; BEN-ARI Y. Cell death, gliosis, and synaptic remodeling in the hippocampus of epileptic rats. *J. Neurobiol.*26:413-425, 1995.
- ROCINHOLI, L.F.; ALMEIDA, S.S.; DE-OLIVEIRA, L.M. Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 30: 407-413, 1997.
- ROCINHOLI, L.F.; OLIVEIRA, L.M.; COLAFEMINA, J.F. Malnutrition and environmental stimulation in rats: wave latencies of the brainstem auditory evoked potentials. *Nutr. Neurosci.*, 4: 199-212, 2001.
- ROGAN, M.T.; LEDOUX, J.E. LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory- evoked responses in a fear conditioning circuit. *Neuron.*, 15: 127-136, 1995.
- ROMANO-SILVA, M.A; GOMEZ, M.V.; BRAMMER, M.J. Modulation of Ca⁺² stimulated glutamate release from synaptosomes by Na⁺ entry through tetrodotoxin-sensitive channels. *Biochem. J.*, 304: 353-357, 1993.
- ROMANO-SILVA, M.A; RIBEIRO-SANTOS, R.; RIBEIRO, A.M; GOMEZ, M.V.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.J. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca⁺² entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria*

- nigriventer* toxin Ph TX2 and potassium depolarization. *Biochem. J.* 296: 313-319, 1994.
- RONCAGLIOLO, M.; GARRIDO, M.; WALTER, T.; PEIRANO, P.; LOZOFF, B. Evidence of altered central nervous system development in infants with iron deficiency anemia at 6-mo: delayed maturation of auditory brainstem responses. *Am.J. Clin. Nutr.*, 68: 683-690, 1998.
- ROTTA, L.N.; SCHIMIDT, A.P.; MELLO e SOUZA, T.; NOGUEIRA, C.W.; SOUZA, K.B.; IZQUIERDO, I.A.; PERRY, M.L.S.; SOUZA, D.O. Effects of undernutrition on glutamate parameters in rat brain. *Neurochem. Res.*, 28: 1181-1186, 2003.
- SALAS, M. ROSALES, A.; TORRERO, C.; PULIDO, S. Effects of neonatal undernutrition on the electrocortical development of the association areas in the rat. *Bol. Est. Med. Biol. Mexico*, 38: 3-9, 1990.
- SANCHEZ-PRIETO, J.; SIHRA, T.S. NICHOLLS, D.G. Characterization of the excitotoxic release of glutamate from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. *J. Neurochem.* 49: 58-64, 1987.
- SANTOS, R.C.; MORAES-SANTOS, T. Effect of neonatal malnutrition on leucine renewal and protein biosynthesis in neurons of rats. *Brain Res. Bull.*, 4: 207-211, 1979.
- SCHOUSBOE, A.; WESTERGAARD, N.; WAAGEPETERSEN H.S.; LARSSON, O.M.; BAKKEN, I.J.; SONNEWALD U. Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia* , 21: 99-105, 1997.
- SCHWEIGERT, I.D. Efeitos da desnutrição protéica sobre o metabolismo cerebral e sistemas glutamatérgico e GABAérgico sob condições de excitotoxicidade em SNC de ratos wistar. Tese de Doutorado, UFRS. Porto Alegre, RS, 2005.
- SHAH, S.N.; BHARGAVA, V.K.; JOHNSON, R.C.; MCKEAN, C.M. Latency changes in brain-stem auditory evoked potentials associated with impaired brain myelination. *Exp. Neurol.*, 58: 111-118, 1978.
- SHIGEMATSU, Y.; NAKAI, A.; KURIAMA, M.; KIKAWA, Y.; KONISHI, I.; STUDO, M.; ITOKAWA, Y. Delayed auditory brainstem response in thiamin-deficient rats. *J. Nutr. Vitaminol.*, 36: 209-215, 1990.
- SJÖSTROM, A.; CONRADI, N.G.; ANDERSSON, S.A. Functional development of the visual system in normal and protein deprived rats. *Acta Physiol. Scan.*, 41: 585-594, 1984.

- SLOVITER R.S. On the relationship between neuropathology and pathophysiology in the Epileptic hippocampus of humans and experimental animals. *Hippocampus*, 4: 250-253, 1994.
- STEIGER, J.L.; GALLER, J.R.; FARB, D.H.; RUSSEK, S.J. Prenatal protein malnutrition reduces α_2 , α_3 and α_{2L} GABA_A subunit mRNAs in the adult septum. *Eur. J. Pharmacol.*, 446: 201-202, 2002.
- SUTULA, T.P.; CAVAZOS, J.E.; WOODARD, A.R. Long-term structural and functional alterations induced in the hippocampus by kindling: implications for memory dysfunction and the development of epilepsy. *Hippocampus*, 4(3): 254-8, 1994.
- TAYLOR, C.P.; DUDEK, E. Excitation of hippocampal pyramidal cells by an electrical field effect. *Journal of neurophysiology*, 52: 126-142, 1984.
- TAUCK, D.L.; NADLER, J.V. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci*, 5: 1016-1022, 1985.
- TILLAKARATINE, N.J.; MEDINA-KAUWE, L.; GIBSON, K.M. Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in neuroal and non-neuronal tissues. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 112: 247-263, 1995.
- TIMM F. Zur histochemie der schwermetalle. Das sulfide-silber-verfahren., *Dtsch Z. Ges. Gerichtl. Med.*, 46: 706-711, 1958.
- TURSKI, W.A. Pilocarpine-induced seizures in rodents—17 years on. *Pol. J. Pharmacol*, 52: 63-65, 2000.
- TURSKI, L.; CAVALHEIRO, E.A.; CZUCZWAR, S.J.; TURSKI, W.A.; KLEINROK, Z. The seizures induced by pilocarpine: Behavioral, electroencephalographic and neuropathological studies in rodents. *Polish Journal of Pharmacology*. 39: 545-555, 1987.
- TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; BORTOLOTTO Z.A.; MELLO L.M.; SCHWARZ M.; TURSKI L. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain res.*, 321 (2): 237-53, 1984.
- TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.*, 9(3):315-335, 1983.
- VESCE, S.; BEZZI, P.; VOLTERRA, A. the highly integrate dialogue between neurons and astrocytes in brain function. *Sci. Prog.* 82: 251-270, 1999.

- VILLESCAS, R.; MARTHENS, E.V.; HAMMER Jr, R.P. Prenatal undernutrition: Effects on behavior, brain chemistry and neuroanatomy in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 14: 455-462, 1981.
- ZAPPONE, C.A.; SLOVITER, R.S. Translamellar disinhibition in the rat hippocampal dentate gyrus after seizures-induced degeneration of vulnerable hilar neurons. *J Neurosci.* 24: 853-864, 2004.
- WANG, J.H.;KO, G.Y.;KELLY, P.T.Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity. *Journal of Clinical Neurophysiology.* 14: 264-293,1997.
- WASTERLAIN C.G.; SHIRASAKA Y. Seizures, brain damage and brain development. *Brain & Development*, 16: 279-95, 1994.
- WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORE, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*11: 25-33, 1990.
- WIGGINS, R.C.; FULLER, G.; ENNA, S.J. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter system. *Life Science*, 35: 2085-2094,1984.
- WIGGINS, R.C. Myelin development and nutritional insufficiency. *Brain Res.*, 257: 151-157, 1982.
- WIGGINS, R.C.; FULLER, G.N. Early postnatal starvation causes lasting brain hypomyelination. *J.Neurochem.*, 30: 1231-1237, 1978
- WIGGINS, R.C. A comparasion of starvation models in studies of brain myelination. *Neurochem. Res.*, 4: 827-830, 1979.
- WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J. Nutr.*, 89: 300-306, 1966.
- WINICK, M.; NOBLE, A. Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Dev. Biol.*, 12: 451-466, 1965.
- WITTER, M. P.; AMARAL D. G. The rat nervous system. Cap.21. Academic Press, Inc, 1995.
- WHO, 2001. Fact sheet N° 165. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentr/factsheets/fs165/en/>. Revisado em fevereiro de 2001. Acessado 15 de janeiro de 2005.

8.ANEXO

8. ANEXO

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Peso cerebral dos animais ao sacrifício..... | 80 |
| 2. | Peso do hipocampo dos animais..... | 80 |
| 3. | Análise densitométrica do brotamento axonal..... | 81 |
| 4. | Conteúdo de proteína no hipocampo..... | 81 |
| 5. | Conteúdo de DNA no hipocampo..... | 82 |
| 6. | Liberação de glutamato no hipocampo dos animais..... | 82 |

Tabela 1: Peso dos Cérebros dos animais dos grupos GNP, GN, GDP e GD.

| Grupos | GNP | GN | GDP | GD |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Peso | 2,084 | 2,033 | 1,694 | 1,896 |
| do | 2,194 | 2,054 | 1,924 | 1,933 |
| Cérebro | 1,981 | 2,004 | 1,922 | 1,972 |
| (g) | 2,035 | 2,044 | 1,816 | 1,884 |
| | 2,021 | 2,164 | 1,724 | 1,925 |
| Média | 2,063 | 2,0598 | 1,816 | 1,922 |
| Desvio | 0,081966 | 0,061182 | 0,107527 | 0,03446 |
| E.P.M | 0,036657 | 0,027361 | 0,048087 | 0,015411 |

Tabela 2: Peso dos Hipocampos dos animais dos grupos GNP, GN, GDP e GD.

| Grupos | GNP | GN | GDP | GD |
|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Peso | 0,1124 | 0,1143 | 0,1199 | 0,1108 |
| do | 0,0978 | 0,1228 | 0,1008 | 0,0834 |
| Hipocampo | 0,1169 | 0,1123 | 0,0922 | 0,1222 |
| (g) | 0,1278 | 0,1023 | 0,1211 | 0,1214 |
| | 0,1233 | 0,1299 | 0,0866 | 0,0978 |
| Média | 0,1156 | 0,1163 | 0,1041 | 0,10712 |
| Desvio | 0,0115 | 0,0105 | 0,0157 | 0,0165 |
| E.P.M | 0,0051 | 0,0047 | 0,0070 | 0,0073 |

Tabela. 3. Valores dos níveis de cinza médios na região supragranular do giro denteado relativos aos níveis de cinza médios do giro denteado, separados por revelação, NT1 a NT6, onde em cada uma destas continham representantes dos quatro grupos (GNP, GN, GDP e GD).

| Grupos | GNP | GN | GDP | GD |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| NT1 | 0,68 | 0,05 | 0,19 | 0,00 |
| NT2 | 0,49 | 0,00 | 0,17 | 0,00 |
| NT3 | 0,54 | 0,00 | 0,19 | 0,00 |
| NT4 | 0,67 | 0,00 | 0,25 | 0,11 |
| NT5 | 0,44 | 0,00 | 0,30 | 0,00 |
| NT6 | 0,63 | 0,01 | 0,19 | 0,10 |
| Média | 57% | 1% | 21% | 4% |
| Desvio | 0,09 | 0,02 | 0,05 | 0,05 |
| E.P.M | 0,04 | 0,01 | 0,02 | 0,02 |

Tabela 4. Conteúdo de proteína no hipocampo dos animais experimentais.

| Grupos | GNP | GN | GDP | GD |
|--|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Conteúdo de proteína no hipocampo (mg/g) | 81,575 | 61,362 | 70,09 | 61,554 |
| | 68,68 | 66,806 | 75,759 | 68,515 |
| | 51,91 | 76,952 | 65,732 | 67,61 |
| | 81,009 | 74,714 | 47,161 | 73,72 |
| | 58,936 | 64,064 | 72,36 | 60,9 |
| Média | 68,422 | 68,779 | 66,220 | 66,459 |
| Desvio | 13,173 | 6,766 | 11,260 | 5,320 |
| E.P.M | 5,891 | 3,026 | 5,035 | 2,379 |

Tabela 5. Conteúdo de DNA no hipocampo dos animais experimentais.

| Grupos | GNP | GN | GDP | GD |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Conteúdo | 3,621 | 2,809 | 4,348 | 2,806 |
| de | 3,814 | 3,011 | 3,076 | 3,068 |
| DNA | 1,913 | 3,652 | 3,266 | 3,107 |
| Hipocampo | 3,949 | 3,869 | 2,595 | 3,036 |
| (mg/g) | 3,661 | 3,941 | 2,253 | 2,942 |
| Média | 3,391 | 3,456 | 3,107 | 2,99 |
| Desvio | 0,836 | 0,514 | 0,799 | 0,12 |
| E.P.M | 0,374 | 0,23 | 0,357 | 0,053 |

Tabela 6. Liberação de glutamato estimulada por KCL na concentração de (40mM) em fatias de hipocampo dos animais experimentais.

| Grupos | GNP | GN | GDP | GD |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Liberação | 5,3161 | 3,09 | 3,069 | 4,6553 |
| Glutamato | 5,54 | 3,339 | 3,55638 | 3,369 |
| Hipocampo | 6,7908 | 4,166 | 4,347 | 4 |
| (nmol/mg proteína) | 5,1287 | 4,8484 | 4,0127 | 3,8829 |
| | 4,6877 | 4,6709 | 5,0549 | 2,9351 |
| Média | 5,4926 | 4,0228 | 4,007 | 3,768 |
| Desvio | 0,790413 | 0,784196 | 0,757731 | 0,653309 |
| E.P.M | 0,353483 | 0,350703 | 0,338868 | 0,292169 |