

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Maria Cristina Ramos Vilela

**ORGANIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE
COMPONENTES NEURAIS DO SISTEMA DE
TEMPORIZAÇÃO CIRCADIANA
EM RATOS JOVENS MALNUTRIDOS**

Recife/PE

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Maria Cristina Ramos Vilela

**ORGANIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE
COMPONENTES NEURAIS DO SISTEMA DE
TEMPORIZAÇÃO CIRCADIANA
EM RATOS JOVENS MALNUTRIDOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Fisiologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Recife/PE

2003

Vilela, Maria Cristina Ramos

Organização morfofuncional de componentes neurais do Sistema de Temporização Circadiana em ratos jovens malnutridos / Maria Cristina Ramos Vilela. – Recife : O Autor, 2003.

101 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Fisiologia, 2003.

Inclui bibliografia, anexos e manuscritos.

1. Neurofisiologia _ Sistema de Temporização Circadiana (STC) – Análise de componentes – Ratos malnutridos. 2. Desnutrição – Componentes do Sistema de Temporização – Efeitos – Ratos. 3. Sistema de Temporização Circadiano (Neurofisiologia) – Análise de componentes. I.Título.

612.8

CDU (2ed.)

UFPE

612.8

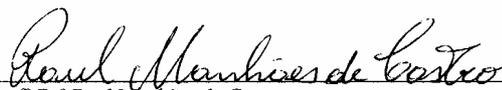
CDD (21.ed.)

BC2004-500

Maria Cristina Ramos Vilela

**ORGANIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE
COMPONENTES NEURAIS DO SISTEMA DE
TEMPORIZAÇÃO CIRCADIANA
EM RATOS JOVENS MALNUTRIDOS**

Aprovada em 29 / 08 / 2003



Profº Drº Raul Manhães de Castro

DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO DA UFPE/PE



Profº Drº Mohammed Saad Lahlou

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA DA UFPE/PE



Profº Drº Valdir Luna da Silva

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA DA UFPE/PE

Recife, 28 de agosto de 2003

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Hugo e Lelia, aos meus irmãos e à Carla, pelas interseções que viabilizaram este sonho.

*Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.*

F. Pessoa

AGRADECIMENTOS

À professora Belmira, minha reverência pelo seu conhecimento, dedicação e competência; meu carinho pela sua pluralidade e o meu muito obrigada pelas orientações no dia-a-dia deste trabalho;

Ao professor Rubens Guedes pelo grande apoio, cessão de materiais e co-orientação nesta pesquisa;

Ao professor Valdir, a Zenira e a Esmeraldo pelo companheirismo durante esta trajetória e ao Gilberto pelo inesperado e incansável apoio técnico e amigo na finalização deste trabalho;

A Heitor e Alex pela prontidão e auxílios nos experimentos;

A todos os professores que abriram as portas de seus laboratórios e que por muitos e muitos detalhes viabilizaram o acontecimento desta pesquisa;

À professora Malu pela amizade e solicitude de todos os momentos;

Aos professores do Departamento de Morfologia em especial, professor Diógenes, Alexandre e Alex, pela cessão das instalações do laboratório de imagem;

À professora Mirian Stela e ao professor Luiz Britto pela gentileza de materiais específicos que viabilizaram a finalização desta pesquisa;

Aos professores: Malu, Ana Durce, Ivone, Eduardo e Almir pelo fornecimento dos ratos para a continuidade deste trabalho;

As professoras Jailma, Maria do Carmo e Francisca pelas orientações sempre que solicitadas;

À Zenira, Mauricéia, Rejane, Paulinho, Heleno, Jacson, Edilene, Edvaldo, Maria José, Zezinho, D. Clara, Nildinha, Josélia e Valdo pela amizade e apoio técnico indispensáveis ao bom andamento do trabalho;

Finalmente, a **todas** as pessoas que se fizeram presentes no período de concepção e elaboração deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!...

*E aprendi que se depende sempre / De tanta muita diferente gente /
Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas.*

*E é tão bonito quando a gente entende
que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá.*

*E é tão bonito quando a gente sente
que nunca está sozinho por mais que pensa estar.*

Luiz Gonzaga Júnior

EPÍGRAFE

*Quem chegou, ainda que apenas em certa medida, à liberdade da razão,
não pode sentir-se sobre a terra senão como andarilho.*

Nietzsche

RESUMO

Estudos sobre os efeitos da má-nutrição na organização temporal do comportamento têm indicado alterações na expressão da ritmicidade circadiana por comprometer a sincronização dos ritmos endógenos ao ciclo claro-escuro ambiental. O presente trabalho investigou em ratos jovens, os efeitos da má-nutrição crônica e severa sobre o desenvolvimento de componentes do sistema de temporização circadiana: retina, núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ), folheto intergeniculado do tálamo (FIG) e tratos retinohipotalâmico (TRH) e genículo-hipotalâmico (TGH). Ratos do grupo controle foram alimentados com uma dieta padrão contendo 22% de proteína desde a gestação e ratos mal nutridos com uma dieta multideficiente desde a gestação (grupo GAA) ou do aleitamento (grupo AA) e mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h sendo analisados aos 27, 30 e 60 dias. Secções coronais diencefálicas do hipotálamo e tálamo foram processadas por imunohistoquímica para visualizar neurônios do TRH e TGH. A retina e o NSQ foram analisados pelo método de Nissl. Comparados ao grupo controle, animais malnutridos exibiram uma redução significativa na área retiniana e na distribuição de células ganglionares; modificações nas dimensões do NSQ e na área ocupada pelos terminais do TRH, mas não na densidade destes terminais. O desenvolvimento do FIG e TGH não foi afetado pela má-nutrição. Os resultados sugerem uma vulnerabilidade diferenciada das regiões estudadas aos efeitos da má-nutrição severa instalada no período crítico do desenvolvimento do cérebro.

ABSTRACT

Studies about the effects of malnutrition on the temporal organization of behavior have indicated a different organization of circadian rhythms in malnourished rats in processes such as entrainment to environmental light-dark cycle (LD). The present study investigated in young albino rats the effects of a chronic and severe malnutrition on the development of five components of the circadian timing system: retina, suprachiasmatic nucleus of hypothalamus (SCN), thalamic intergeniculate leaflet (IGL) and retino-hypothalamic (RHT) and geniculo-hypothalamic tracts. Rats of control group fed a commercial chow diet containing 22% protein since gestation and malnourished rats fed a multideficient diet since gestation (GLA group) or lactation (LA group) and were maintained under a 12:12 h LD. They were analyzed at 27, 30-33 and 60-63 days of age. Coronal sections through hypothalamus and thalamus were processed by immunohistochemistry in order to visualize neurons of RHT and GHT. The retina and cytoarchitectonic limits of SCN were analyzed by Nissl staining. Compared to control groups, malnourished animals since gestation exhibited significant alterations on the retinal area and in the topographical distribution of ganglion cells; reduction on the SCN dimensions and in the area occupied by terminals of RHT but not in the density of these terminals. The development of IGL and GHT was not affected by malnutrition. The results suggest a differential vulnerability of the components analyzed during a severe malnutrition on the critical period of brain development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.** Esquema ilustrando os períodos de desenvolvimento da neurogênese e sinaptogênese do NSQ. p. 16
- FIGURA 2.** Distribuição topográfica de células ganglionares retinianas com projeção para o NSQ. Retirada de Moore *et. al.* (1995). p.18
- FIGURA 3.** Esquema ilustrando a evolução temporal de eventos envolvidos com a neurogênese, diferenciação, sinaptogênese e gliogênese no NSQ. p.20
- FIGURA 4A.** Esquema das principais aferências e eferências do STC. p.22
- FIGURA 4B.** Esquema ilustrando os principais neurotransmissores envolvidos nas principais aferências e eferências do STC. p.22
- FIGURA 5.** Modelo proposto por Brewer *et. al.* (2002) sobre mecanismos de ação do NPY no STC. p.25

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT = Serotonina
AHA = Área Hipotalâmica Anterior
AHL = Área Hipotalâmica Lateral
AMPc = Adenosina Monofosfato Cíclico
AVP = Arginina Vasopressina
BB = Bombesina
CE = Ciclo Claro-Escuro
CGRP = Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CRF = Curva de Resposta de Fase
DA = Depressão Alastrante
DBR = Dieta Básica Regional
E_n = n-dia embrionário
ENK = Enkefalina
FIG = Folheto Intergeniculado
GABA = Ácido Gama Amino Butírico
GLU = Glutamato
GFAP = Proteína Ácida Fibrilar de Glia
GRP = Peptídeo Liberador de Gastrina
HRP = Peroxidase do Rábano Silvestre
NGLd = Núcleo Genuculado Lateral Dorsal
NGLv = Núcleo Genuculado Lateral Ventral
NMDA = N-Metil D-Aspartato
NPY = Neuropeptídeo Y
NSQ = Núcleo Supraquiasmático
PACAP = Peptídeo Ativador da Adenilato Ciclase da Pituitária
PKC = Proteína Quinase C
P_n = n-dia pós-natal
SNC = Sistema Nervoso Central
SP = Substância P
STC = Sistema de Temporização Circadiana
TGH = Trato Genuculo-Hipotalâmico
THG = Trato Hipotálamo-Genuculado
TIG = Trato Intergeniculado
TRH = Trato Retino Hipotalâmico
TRT = Trato Retino Talâmico
VIP = Peptídeo Intestinal Vasoativo
ZSPV = Zona Subparaventricular

SUMÁRIO

Pág.

I . INTRODUÇÃO

I.1. O sistema de temporização circadiana	11
I.2. O núcleo supraquiasmático	13
I.2.1. Aspectos anatômicos e neuroquímicos	13
I.2.2. Desenvolvimento do NSQ	15
I.2.3. Aferências para o NSQ	17
I.2.3.1. Tracto retinohipotalâmico	17
I.2.3.2. Outras aferências	18
I.2.4. Eferências do NSQ	19
I.3. O FIG e o trato genículo-hipotalâmico	20
I.3.1. Ações do NPY no STC	23
I.4. Efeitos gerais da má nutrição sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central	26
I.4.1. Modelo experimental da má nutrição pela dieta básica regional	31
I.5. Efeitos da má nutrição sobre o STC	33
I.6. Hipóteses do presente Trabalho	35
I.7. Objetivos	36
1.7.1. Objetivo geral	
1.7.2. Objetivos específicos	

II. MANUSCRITO SUBMETIDO	38
---------------------------------	----

III. CONCLUSÕES	75
------------------------	----

IV. PERSPECTIVAS	76
-------------------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
-----------------------------------	----

ANEXOS

ANEXO A - Materiais e Métodos	88
-------------------------------	----

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética	101
--------------------------------------	-----

I. INTRODUÇÃO

I.1. O SISTEMA DE TEMPORIZAÇÃO CIRCADIANA

A terra é um ambiente rítmico, marcado por variações sazonais de temperatura, umidade e períodos fóticos no decorrer do ano. Dentro de um intervalo de tempo menor, temos também a variação de claro e escuro e o fluxo e refluxo das marés que ocorrem dentro do espaço de um dia. Vários autores discutem que para competir de forma efetiva e, portanto, sobreviver, o comportamento dos seres vivos deve oscilar de forma sincronizada com o meio ambiente. Nessa perspectiva, a sobrevivência do animal pode ser influenciada pelo ajuste a estes osciladores ambientais (VITATERNA *et. al.*, 2001) e para isto, reconhece-se que quase todas as funções orgânicas mudam de acordo com os ciclos geofísicos diários e estabelecem, no período de um dia, flutuações nestas funções conhecidas como ritmos circadianos. Tais funções são reguladas por várias estruturas do sistema nervoso central (SNC), as quais são moduladas por um sistema cerebral de temporização circadiana (STC). Este sistema dispõe de mecanismos multioscilarórios que sincronizam ritmos endógenos com eventos externos, sendo dotado de um poder de amplificação porque transmite ritmicidade a regiões cerebrais que regulam funções neurovegetativas, endócrinas e comportamentais.

Estudos sobre o STC têm enfatizado análises tanto do ponto de vista molecular quanto comportamental no sentido de elucidar mecanismos envolvidos na relação entre a atividade de neurônios específicos e a elaboração de padrões comportamentais rítmicos (AGUILAR-ROBLERO *et. al.*, 2001).

Embora o estabelecimento de ritmos seja de caráter endógeno e ocorra sem a necessidade de estímulos do ambiente externo, uma característica destes é a capacidade de serem sincronizados, ou arrastados, aos ciclos ambientais (MOORE, 1992). A sincronização é definida pelo alinhamento dos ritmos aos fornecedores externos de tempo (Zeitgebers) dentre os quais podemos citar o ciclo claro-escuro (CE) ambiental, as variações na pressão atmosférica e/ou no campo geomagnético, os estímulos acústicos, visuais e sociais e ainda a disponibilidade de alimentos

(MARQUES e MENNA-BARRETO, 1997; VITATERNA, 2001). Os ritmos podem apresentar diferentes frequências. Muitos deles são claramente associados a um ciclo CE ambiental, sendo conhecidos como ritmos circadianos cujo período varia de 20 a 28 horas, de acordo com a espécie. Ritmos com períodos inferiores a 20 horas são denominados ultradianos e com períodos superiores a 28 horas são denominados infradianos. Na ausência dos estímulos fornecidos pelo tempo, o relógio endógeno assume uma frequência natural de livre curso (MORIN, 1994).

A relação entre tempo circadiano de estimulação fótica e as conseqüentes mudanças nas fases do ritmo endógeno podem ser expressas como curva de resposta de fase (CRF). Esta é uma representação gráfica da dinâmica do comportamento de um oscilador quando submetido a um pulso de estimulação que pode acontecer em diferentes horas do dia. Para tanto devem ser consideradas as fases em que ocorrem atividade e repouso de um organismo em livre-curso. Se o organismo for diurno, sua fase de atividade será considerada como o “dia subjetivo” e a de repouso como “noite subjetiva”. A situação se inverte para os organismos noturnos (MORIN, 1994 e MARQUES e MENNA-BARRETO, 1997).

De uma maneira esquemática o STC é constituído por três principais componentes: 1) as aferências neuronais de várias partes do sistema nervoso central (SNC), particularmente das células ganglionares da retina (fotoestimulação) para o núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ); o qual desempenha um importante papel como oscilador circadiano neste sistema; 2) a composição neuronal e glial do NSQ com a expressão rítmica de genes-relógio; 3) as eferências do NSQ através de um sistema amplificador de sinais que promove uma sincronização rítmica de regiões neurais envolvidas com o comportamento motor, emocional, neurovegetativo e reprodutor (GHOSH *et. al.*, 1997; WEAVER, 1998, revisões em IBATA *et. al.*, 1999; ESSEVELDT *et. al.*, 2000; MICHEL e COLWELL, 2001 e AGUILAR-ROBLERO *et. al.*, 2001).

As características intrínsecas do NSQ apresentam modificações ao longo da vida do animal, que ocasionam variações nos padrões de ritmicidade com a idade (CIPOLLA *et. al.*, 1987 e STOPA *et. al.*, 1999; AUJARD, 2001; CASTAÑÓN-CERVANTES e CINTRA, 2002). As aferências fóticas e não fóticas para o NSQ desempenham um importante papel na modulação dessas características intrínsecas, podendo em algumas situações bloquear os efeitos da luz no sistema circadiano (BREWER *et. al.*, 2002).

Vários ritmos circadianos se desenvolvem independentemente com distintos padrões de expressão ontogenética. De acordo com Moore (1991) o desenvolvimento de uma função circadiana depende do desenvolvimento do próprio NSQ e das vias aferentes sincronizadoras, bem como do desenvolvimento e acoplamento do sistema eferente do NSQ e maturação do sistema eferente.

I.2. O NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

I.2.1. Aspectos Anatômicos e Neuroquímicos

O NSQ em mamíferos, compreende um par de núcleos diencefálicos localizados adjacentes ao terceiro ventrículo imediatamente acima do quiasma óptico (ESSEVELDT *et. al.*, revisão, 2000). Sua situação espacial é a porção anterior e ventral do hipotálamo. Apresenta-se como um núcleo complexo com reconhecidas subdivisões, contendo vários tipos de neurônios com arborização dendrítica relativamente simples (VAN DEN POL, 1980). Os limites dorsal, lateral, rostral e caudal podem ser determinados pela marcação de Nissl por causa da maior densidade de neurônios do NSQ em relação ao hipotálamo que o rodeia (ABRAHAMSON e MOORE, 2001).

Embora sua disposição anatômica seja similar entre os mamíferos, há diferenças significativas em relação à sua forma tridimensional, entre as espécies. A anatomia intrínseca do NSQ foi descrita em ratos albinos, com o uso de diversas técnicas, tais como impregnação pela prata (Golgi), injeção com peroxidase do rábano silvestre (HRP, do inglês “horseradish peroxidase”) e coloração pela técnica de Nissl. Nesta ampla abordagem em que foram avaliados o tamanho (comprimento antero-posterior, largura e volume total), a densidade celular, o número e o tamanho das células do NSQ, os axônios e a arborização dendrítica, foi visto que os neurônios do NSQ são os menores do hipotálamo, estando entre os menores do cérebro (VAN DEN POL, 1980). Güldner (1983) estimou em ratos Sprague Dawley que o número de neurônios do NSQ (unilateralmente) varia de 11.000 (11.400 em machos) e 12.000 (11.900 em fêmeas). Este mesmo autor também descreveu que os volumes dos núcleos neuronais foram significativamente maiores em fêmeas do que em

machos e que entre os sexos existem diferentes padrões de atividade neuronal, sendo esta atividade maior no NSQ de fêmeas do que no de machos. Quanto ao volume unilateral do NSQ, foi estimado $0,068 \text{ mm}^3$ para ratos machos albinos (VAN DEN POL, 1980).

A composição neuroquímica do NSQ reflete sua complexidade funcional. Neurônios contendo ácido gama amino butírico (GABA) estão distribuídos ao longo de todo o núcleo, mas outros neurotransmissores apresentam distribuições restritas a algumas regiões específicas deste núcleo. Considerando critérios morfológicos, funcionais e neuroquímicos, o NSQ pode ser dividido em duas regiões (WATTS e SWANSON, 1987, IBATA, 1999, ESSEVELDT *et. al.*, 2000 e ABRAHAMSON e MOORE, 2001):

1) Região Ventrolateral, caracterizada principalmente pela presença de neurônios intrínsecos produtores de Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP). Esta região está relacionada com o mecanismo de sincronização dos ritmos endógenos aos eventos externos e recebe aferências da retina e folheto intergeniculado do tálamo (FIG) através dos tractos Retino-Hipotalâmico (TRH) e Genículo Hipotalâmico (TGH), respectivamente, bem como uma aferência serotoninérgica dos núcleos da rafe. Nesta região também foram descritos neurônios contendo o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (PARK *et. al.*, 1993), peptídeo liberador de gastrina (GRP) e bombesina (BB) (VAN DEN POL e TSUJIMOTO, 1985).

2) Região Dorsomedial, caracterizada principalmente pela presença de neurônios intrínsecos produtores de arginina vasopressina (AVP). Esta região está relacionada com a gênese de ritmos circadianos e com as projeções eferentes do NSQ que transferem ritmicidade a outras regiões cerebrais. O conteúdo de AVP no NSQ apresenta um ritmo circadiano endógeno em condições de livre curso, não determinado pelas condições de luminosidade externa (EARNEST e SLADEK, 1986). Nesta região foi também descrita a presença de neurônios contendo angiotensina II e somatostatina (WATTS e SWANSON, 1987).

Entre estas duas regiões do NSQ existem conexões, principalmente na parte dorsomedial onde pode ser observada uma expressiva marcação de terminais imunorreativos ao VIP fazendo contatos sinápticos com dendritos que expressam imunoreatividade à AVP (WATTS e SWANSON, 1987, IBATA, 1993, IBATA, 1999 e ABRAHAMSON e MOORE, 2001).

Células da glia são abundantes no hipotálamo e particularmente no NSQ (MORIN *et. al.*, 1989; IBATA *et. al.*, 1999). A razão de células da astroglia/neurônio é de aproximadamente 1:3 (1:2,6 em machos e 1:3,4 em fêmeas) (GÜLDNER, 1983). Os astrócitos do NSQ são distribuídos predominantemente na região ventrolateral do NSQ, muito embora aposições sinápticas entre prolongamentos de astrócitos e neurônios foram encontradas ao longo de todo este núcleo (Revisão em IBATA, 1999, TAMADA *et. al.*, 1998 e MICHEL e COLWELL, 2001). As interações entre neurônios, glia e o ambiente extracelular são necessárias para regular as oscilações circadianas no NSQ. Na maioria dos astrócitos ocorre acoplamento glia/glia através de junções elétricas e aposições glia/neurônio que envolvem porções dos elementos pré e pós sinápticos neuronais (TAMADA *et. al.*, 1998). Prosser *et. al.* (1994) demonstraram que o desacoplamento das junções elétricas entre os astrócitos e a inibição do metabolismo da glia no NSQ foram capazes de alterar o padrão circadiano de atividade neuronal o que sugere uma importante função da glia na gênese dos ritmos circadianos. Adicionalmente os astrócitos podem proteger os neurônios do NSQ e do FIG da toxicidade induzida por quantidades excessivas de aminoácidos excitatórios liberados por vias aferentes a estes núcleos (TAMADA *et. al.*, 1998). A relação entre astrócitos e o TRH foi também demonstrada em um estudo no qual a enucleação bilateral induziu uma redução significativa no desenvolvimento pós-natal dos prolongamentos gliais no NSQ, sugerindo a importância da projeção retinohipotalâmica sobre mecanismos de diferenciação da glia neste núcleo (MUNEKAWA *et. al.*, 2000).

I.2.2. Desenvolvimento do NSQ

Em ratos, cujo período gestacional é de 21 dias, a neurogênese do NSQ ocorre entre 13,5 e 16,5 dias após a fertilização, com pico no 14,5º dia, sendo a sinaptogênese do NSQ relativamente retardada para o período pós-natal (MORIN, 1994). Os contatos sinápticos são raros do 21º dia embrionário (E21) até o segundo dia pós-natal (P2), mas aumentam de forma notável de P4 a P10 e continuam os processos de maturação até aproximadamente P30, onde estabelecem o padrão adulto

(MOORE e BERNSTEIN, 1989; TAKATSUTJI *et. al.*, 1995). Ver esquema da **FIGURA 1**.

As expressões de VIP e do seu RNA mensageiro, por exemplo, foram inicialmente detectadas no dia E18 em ratos albinos, nas porções rostral e ventrolateral do NSQ e posteriormente aumentadas de forma gradativa e coincidente com o tempo da formação das aferências para o NSQ. Entre P10 e P20 há um grande aumento na concentração do RNAm e a partir de P20 é estabelecido o padrão adulto, onde um ritmo de atividade circadiana desse peptídeo é influenciado pela estimulação fótica proveniente do TRH (BAN *et. al.*, 1997).

Os elementos gliais imunorreativos à GFAP primeiro aparecem em E20 e aumentam drasticamente entre os períodos P3 e P4, seguem gradualmente e novamente apresentam um aumento significativo entre P20 e P25 (IBATA *et. al.*, 1999; MUNEKAWA *et. al.*, 2000). De P25 a P30, ocorre uma diminuição no nível de GFAP, coincidente com a maturação do TRH (MUNEKAWA *et. al.*, 2000). Estes autores atribuem o primeiro pico de marcação de GFAP ao crescimento do número de astrócitos, enquanto que o segundo pico estaria acontecendo por uma expansão do prolongamento da glia durante o seu processo de diferenciação.

Há evidências de que a ritmicidade circadiana em ratos albinos e hamsters já está presente nos dias embrionários E19 e E14 respectivamente, antes mesmo da sinaptogênese ter sido estabelecida entre os neurônios (revisão em MORIN, 1994).

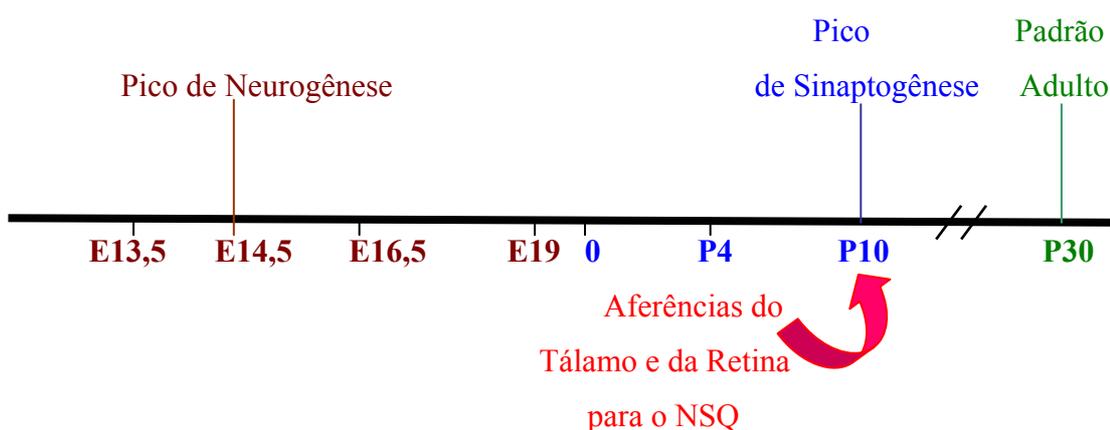


FIGURA 1. Esquema ilustrando os períodos de desenvolvimento da neurogênese e sinaptogênese do NSQ.

I.2.3. Aferências para o NSQ

I.2.3.1. Tracto Retinohipotalâmico

Várias pesquisas foram realizadas com o uso de marcadores retrógrados para caracterizar o desenvolvimento e as características do TRH. Lesões neste tracto comprometem a sincronização e a ritmicidade do sistema de temporização (revisões em MORIN 1994, WEAVER, 1998).

Johnson *et. al.* (1988), Levine *et. al.* (1991) e Speh e Moore (1993) Takatsuji *et. al.* (1995) dentre outros mostraram que em ratos o TRH pode ser dividido em três componentes, sendo a maior parte desta projeção para o NSQ. O primeiro componente aparece como uma banda muito densa de terminais na borda mais dorsal do quiasma óptico e nível mais rostral do NSQ. Neste núcleo, vê-se uma densa projeção para a subdivisão ventrolateral, com algumas fibras estendendo-se para a subdivisão dorsomedial. O segundo componente é uma extensão do plexo axonal do NSQ para a área hipotalâmica anterior (AHA), área pré-óptica medial e área retroquiasmática. O terceiro componente consiste de axônios estendendo-se ao longo da margem do quiasma óptico a partir do NSQ e deixando lateralmente o tracto óptico para formar um plexo terminal na área hipotalâmica lateral (AHL).

Neurotransmissores associados com o TRH incluem glutamato (MOFFETT *et. al.*, 1990; MOGA e MOORE, 1996 e GHOSH *et. al.*, 1997), substância P (SP) e peptídeo ativador da adenilato ciclase da pituitária (PACAP) (HANNIBAL *et. al.*, 1997).

As fibras do TRH começam a serem projetadas para a parte ventral e ventrolateral do NSQ entre P0 e P2, tempo em que ainda são muito escassas e assim permanecem até P6 (SPEH e MOORE, 1993; MORIN, 1994 e TAKATSUJI *et. al.*, 1995). O número e a densidade de fibras para o NSQ, áreas adjacentes e para a AHL aumentam gradualmente entre P10 e P20 (SPEH e MOORE, 1993). Entre P20 e P30 ocorre uma diminuição dessas fibras na porção dorsolateral do NSQ ficando estabelecido o padrão adulto do TRH (SPEH e MOORE, 1993; TAKATSUJI *et. al.*, 1995). O processo de sinaptogênese inicia-se entre P3 e P4, ocorrendo primariamente na AHL e posteriormente no NSQ. Em P10 estima-se que 70% das sinapses já foram estabelecidas neste núcleo (MOORE e BERNSTEIN, 1989; SPEH e MOORE, 1993).

Aproximadamente 0,1% dos axônios do nervo óptico entram no NSQ (PICKARD, 1980). Uma distinta classe de células ganglionares da retina projeta para o NSQ através do TRH cumprindo a função de sincronização ambiental com o fornecimento de informações fóticas para o NSQ, provocando mudanças nas frequências de disparo de neurônios intrínsecos a este núcleo em resposta a mudanças nos níveis de intensidade luminosa. Estas células que projetam para o hipotálamo correspondem a uma subpopulação de neurônios amplamente distribuídos na retina, os quais emitem escassos ramos dendríticos e de acordo com critérios morfológicos e funcionais foram classificadas como células do tipo III ou W (FUKUDA, 1977, MOORE, 1995). A **FIGURA 2**, retirada de MOORE *et. al.* (1995), ilustra a distribuição topográfica de células ganglionares retinianas com projeção para o NSQ.

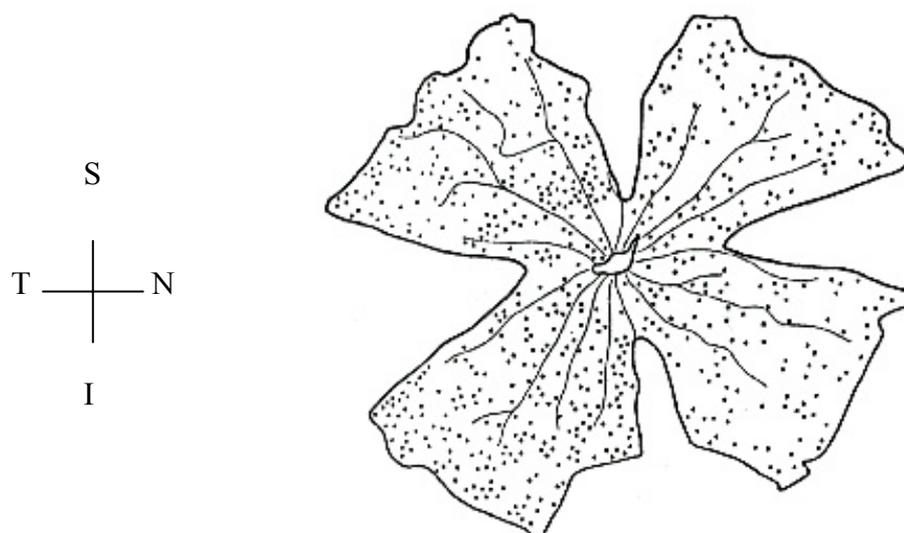


FIGURA 2. Distribuição topográfica de células ganglionares retinianas com projeção para o NSQ. Retirada de Moore *et. al.* (1995). Observar a distribuição destas células de uma forma relativamente uniforme ao longo das regiões centrais e periféricas da retina.

I.2.3.2. Outras Aferências

O FIG do tálamo também é inervado por colaterais de axônios das mesmas células ganglionares da retina que projetam para o NSQ (PICKARD, 1985 e IBATA, 1999). As aferências do FIG para o NSQ através do tracto genículo-hipotalâmico (TGH), representam, portanto, uma via indireta de sincronização diante das informações fóticas da retina e conferem ao FIG a sua participação como um dos

componentes do STC envolvidos com a sincronização dos ritmos endógenos ao ciclo claro-escuro ambiental (MOORE, 1995). Outra importante aferência para o NSQ é a projeção serotoninérgica originada em Núcleos da Rafe do tronco cerebral, a qual carrega informações de estímulos não fóticos para o núcleo em questão (ABRAHAMSON e MOORE, 2001). Em ratos recém-nascidos, fibras imunorreativas ao neuropeptídeo Y (NPY) e à serotonina (5-HT) foram detectadas de forma muito escassa no NSQ, porém esta imunoreatividade aumentou de forma significativa entre os dias P10 e P15 e atingiu o padrão adulto em torno de P20 (TAKATSUJI *et. al.*, 1995). Projeções recíprocas entre os núcleos supraquiasmáticos foram também evidenciadas a partir de neurônios contendo VIP (IBATA, 1999). Outras projeções para o NSQ se originam de diversas regiões do cérebro, dentre as quais podemos citar o núcleo septal lateral, núcleo hipotalâmico posterior ventromedial e dorsomedial e o núcleo paraventricular do tálamo e outras ainda de menor pulso excitatório provenientes do córtex infralímbico, dos núcleos da base da estria terminal, área pré-ótica medial, zona incerta e subiculum ventral (MOGA e MOORE, 1996).

I.2.4. Eferências do NSQ

As conexões eferentes do NSQ viabilizam o marca-passo circadiano a controlar o ritmo tanto através de conexões locais, como também com outros núcleos hipotalâmicos, estes mais diretamente relacionados às funções comportamentais.

Dentre as conexões hipotalâmicas e talâmicas há projeções rostralmente do NSQ para a área hipotalâmica anterior e área pré-ótica medial; lateralmente para área hipotalâmica lateral; caudalmente para uma região situada entre o núcleo paraventricular e a área hipotalâmica anterior, denominada “zona subparaventricular” (ZSPV). Algumas projeções extra-hipotalâmicas atingem a área septal, o núcleo paraventricular do tálamo e a substância cinzenta periaquedutal rostral (WATTS e SWANSON *et. al.*, 1987). Morin *et. al.* (1994) mostram que a ZSPV também envia fibras de volta para o NSQ e para toda extensão da substância cinzenta periaquedutal,

sugerindo que esta região possa atuar como um centro redistribuidor, e talvez amplificador, das funções do NSQ em roedores. As conexões com o sistema límbico são estabelecidas principalmente através de conexões com os núcleos adjacentes, como por exemplo, o núcleo paraventricular do tálamo, representando um importante elo neuroanatômico entre os efeitos fóticos e o mecanismo neuroendócrino, além das implicações na coordenação do sistema nervoso autônomo e controle do comportamento emocional (WATTS *et. al.*, 1987; WATTS, 1991). A **FIGURA 3** esquematiza o desenvolvimento da neurogênese, das projeções aferentes ao NSQ bem como do processo de diferenciação neuronal e glial a partir da expressão de VIP e GFAP, que ocorrem ao longo das fases de gestação e aleitamento.

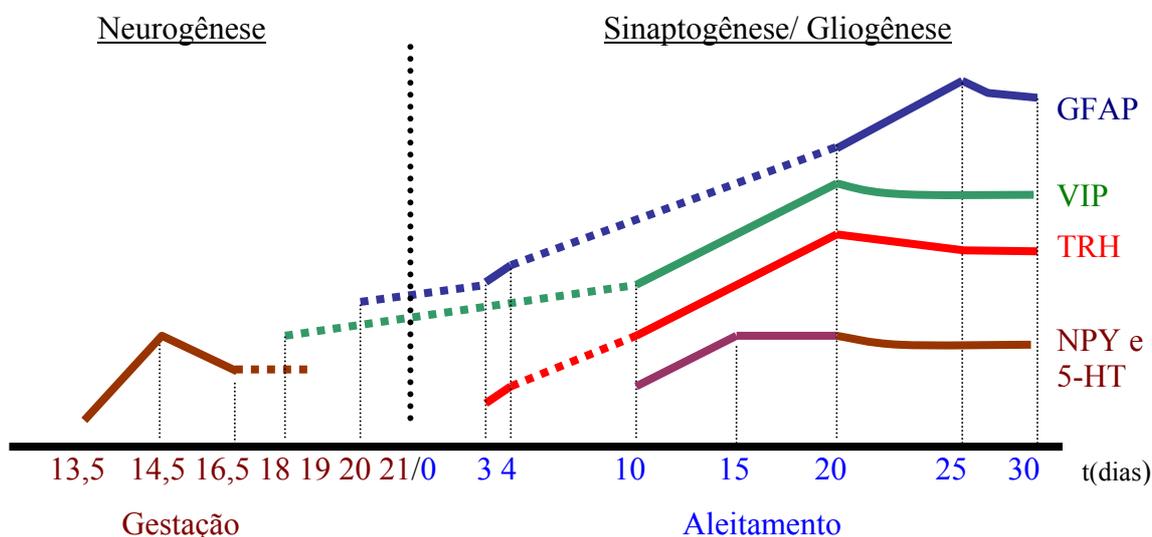


FIGURA 3. Esquema construído a partir de dados de diversos autores, ilustrando a evolução temporal de eventos envolvidos com a neurogênese, diferenciação, sinaptogênese e gliogênese no NSQ. As curvas estabelecidas neste esquema são apenas de efeito comparativo e não guardam relação de proporcionalidade com o eixo das ordenadas.

I.3. O FIG E O TRATO GENÍCULO HIPOTALÂMICO

O FIG foi primeiro descrito por Hickey e Spear (1976) em mamíferos roedores, como um pequeno grupo de células derivadas embriologicamente do diencéfalo ventral, situado no complexo geniculado lateral do tálamo entre os núcleos geniculado lateral dorsal (NGLd), e geniculado lateral ventral (NGLv) (PICKARD, 1985; IBATA *et. al.*, 1988 e MOORE, 1989). Estes últimos recebem densa inervação da retina, estando envolvidos com o processamento da informação

visual de uma forma distinta da projeção específica para o FIG (CARD e MOORE, 1989). Em primatas o FIG corresponde a uma parte do núcleo perigeniculado (KAAS, e HUERTA, 1988; CHEVASSUS-AU-LOUIS e COOPER, 1998; CAVALCANTE *et. al.*, 2002).

Vários critérios têm sido adotados para definir o FIG como uma região do complexo geniculado lateral (ver revisão MORIN, 1994):

- a) receber aferências diretas da retina;
- b) conter células imunorreativas a NPY;
- c) conter células que projetam para o NSQ;
- d) conter células que projetam para o FIG contralateral;
- e) receber inervações imunorreativas à Substância P.

Card e Moore (1989) caracterizaram por marcação retrógrada do FIG a partir do NSQ neurônios pequenos e bipolares evidentes no FIG, tanto na área interposta entre o NGLv e NGLd como na região que estende ventrolateralmente através da zona incerta. Viram que os pericários destes neurônios são caracteristicamente alongados com dendritos primários nos dois extremos polares dos seus eixos e que estes dendritos estão confinados aos limites do núcleo. Ficou evidenciada a marcação ipsilateral do FIG e que os neurônios do FIG desta região coincidem com a localização imunohistoquímica de NPY.

Em mamíferos roedores, as projeções do FIG para o NSQ contêm NPY e GABA. Um grupo distinto de neurônios que não contém NPY, mas são imunorreativos ao peptídeo encefalina (ENK) foram também descritos no FIG, com projeção para o FIG contralateral. (CARD e MOORE, 1989). O FIG também recebe uma projeção direta do NSQ através do tracto hipotálamo-talâmico o qual contém o peptídeo liberador de gastrina (GRP) (CARD e MOORE, 1989 e MORIN, 1994).

Em primatas, o núcleo perigeniculado contém células imunorreativas ao NPY, porém a projeção genículo-hipotalâmica contendo NPY não foi encontrada em todas as espécies até então analisadas (MOORE, 1989; CHEVASSUS-AU-LOUIS E COOPER, 1998). No entanto, mesmo na ausência desta projeção há evidências em humanos de que neurônios contendo NPY estão presentes no NSQ, tendo sido sugerido que os mesmos possam participar na modulação da ritmicidade endógena deste núcleo (MOORE, 1989).

A **FIGURA 4A** esquematiza as principais aferências e eferências para o NSQ e a **FIGURA 4B** resume os neurotransmissores envolvidos com as mesmas.

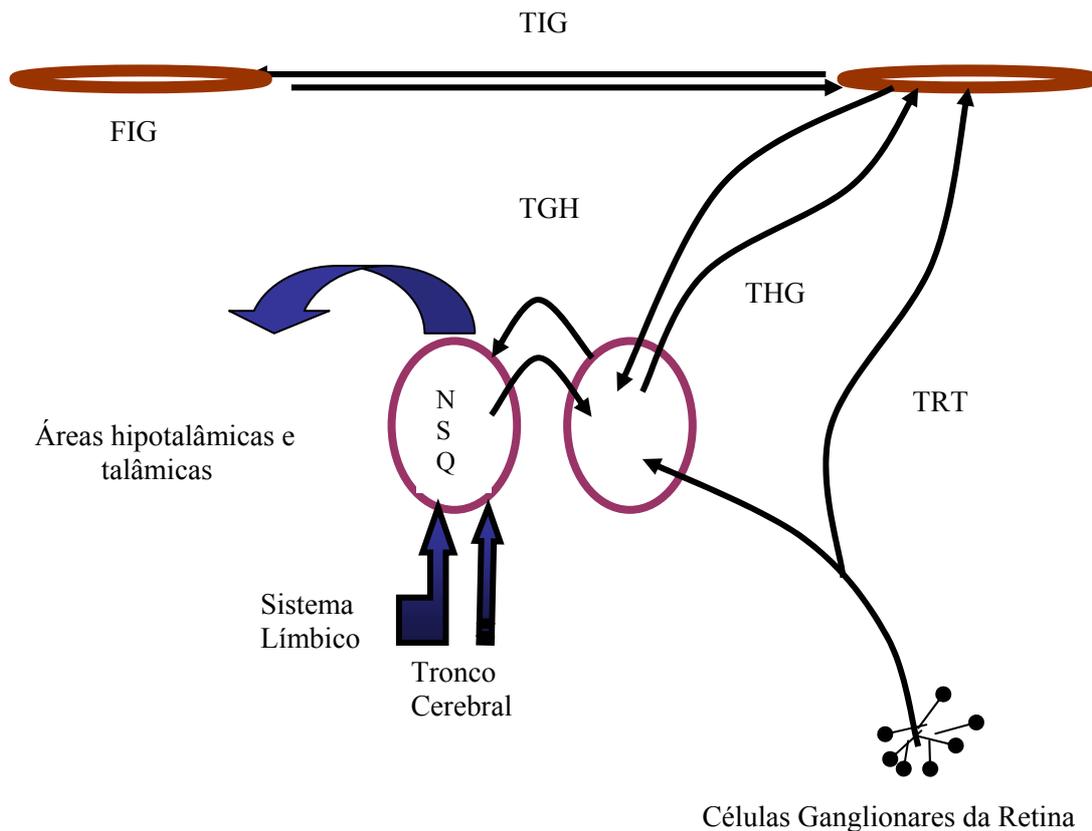


FIGURA 4A Esquema mostrando as principais aferências e eferências do STC.

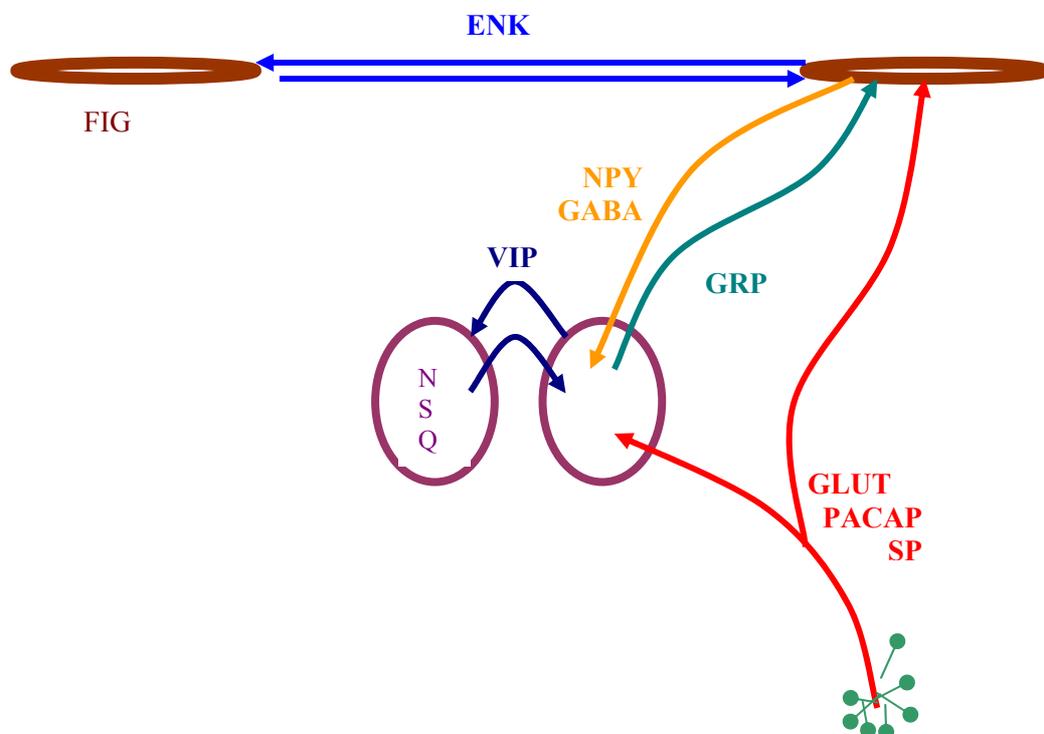


FIGURA 4B Esquema mostrando os principais neurotransmissores envolvidos nas principais aferências e eferências do STC.

I.3.1. Ações do NPY no STC

O NPY é um polipeptídeo de 30 aminoácidos da família dos peptídeos pancreáticos (TATEMOTO, 1982) que apresenta ampla distribuição no sistema nervoso central e periférico (COLMERS e BLEAKMAN, 1994). Uma análise ontogenética sobre a expressão deste peptídeo no cérebro de ratos evidenciou que o mesmo já pode ser detectado em neurônios no dia embrionário E13 e que a concentração do mesmo em várias regiões durante o período pré-natal sugere um importante papel deste peptídeo durante o desenvolvimento do cérebro (WOODHAMS *et. al.*, 1985).

Os níveis de NPY no NSQ representam um indicador da atividade do TGH, o qual aumenta em resposta às mudanças de condições fóticas do claro para o escuro e do escuro para o claro (SHINOHARA *et. al.*, 1993). Os tipos de sinapses que fibras contendo NPY fazem no NSQ são axo-dendriticas e axo-somáticas, de natureza predominantemente inibitória especialmente na porção ventromedial, (IBATA *et. al.*, 1988). Tem sido descrito que o conteúdo de NPY no NSQ apresenta um ritmo fásico, bimodal no ciclo claro/ escuro, com dois picos por dia que acompanham as transições fóticas. Shinohara *et. al.* (1993) e Shinohara e Inouye (1995) relataram que a concentração de NPY no NSQ vai aumentando logo que se instala a luz alcançando um pico 120 minutos após 2 horas que a luz foi aplicada e permaneceu. Neste trabalho, os pesquisadores também mostraram que um pulso de luz de 5 minutos de duração é suficiente para aumentar a concentração de NPY no NSQ e que tempo maior do que este não muda o padrão de resposta. Por outro lado, as respostas à luz contínua no NSQ têm uma duração de aproximadamente 4 horas (SHINOHARA e INOUE, 1995). Estes trabalhos sugerem que o NPY exerceria uma ação complementar à exercida por neurônios contendo VIP durante o processamento da informação fótica no NSQ, ou seja, enquanto os neurônios contendo VIP transmitem informações sobre a duração do período de iluminação, o NPY sinalizaria informações sobre as transições dos períodos fóticos (SHINOHARA e INOUE, 1995).

O NPY também exerce funções modulatórias sobre a atividade do NSQ diante de estímulos não fóticos. Evidências obtidas em hamsters indicam que dentre estas funções, o NPY é capaz de induzir no ritmo circadiano, avanço de fase no dia

subjetivo e atraso de fase na noite subjetiva, diante de estímulos novos capazes de aumentar a atividade locomotora dos animais (JANIK *et. al.*, 1995) de forma similar ao obtido com estímulos fóticos (SHINOHARA *et. al.*, 1993). Um aumento na expressão do gene imediato c-Fos é induzido em neurônios imunorreativos ao NPY, também diante de estímulos não fóticos (JANIK *et. al.*, 1995) e a aplicação de anticorpos contra NPY é capaz de atenuar os desvios de fase diante destes estímulos (BIELLO, 1995). As ações modulatórias do NPY sobre o NSQ se expressam de forma antagônica àquelas do glutamato diante da informação luminosa, a partir do TRH. As alterações na fase do ritmo induzidas pelo glutamato durante a noite subjetiva são antagonizadas pelo NPY assim como o glutamato antagoniza os efeitos do NPY durante o dia subjetivo (BIELLO *et. al.*, 1997). Há também evidências no rato, de que durante o desenvolvimento da inervação proveniente dos Núcleos da Rafe para o NSQ, o NPY possa desempenhar uma importante função no estabelecimento de conexões realizadas pelos neurônios serotoninérgicos (UEDA *et. al.*, 1995).

As diversas funções no NPY ocorrem através de interações deste neurotransmissor com múltiplos receptores acoplados à proteína G. Os receptores Y encontrados diferem entre si na sua porção transmembrana (LARHAMMAR *et. al.*, 2001). Muitos estudos têm sido feitos no intuito de definir quais os receptores e precisas localizações destes no NSQ. Yannielli e Harrington (2001) apontam que os efeitos deste neurotransmissor no STC são diferentes de acordo com o período do dia em que são liberados, assim como dependem da ligação com diferentes subtipos de receptores, o Y₂ mediando os efeitos durante o dia e Y₅ mediando os efeitos durante a noite. Os processos de transdução dos sinais também são diversos. Possivelmente a atuação do NPY no receptor Y₂ estará desencadeando a ativação de PKC que irá fosforilar proteínas próprias do NSQ (BIELLO *et. al.*, 1997; BREWER *et. al.*, 2002). Por outro lado, foi sugerido que os efeitos do NPY no receptor Y₅ durante a noite subjetiva podem ocorrer devido a outros possíveis mecanismos que levarão a: 1) diminuição do aumento da atividade elétrica induzida pela luz; 2) diminuição do Ca²⁺ e do AMP_c intracelulares; 3) regulação da expressão de genes-e proteínas-relógio; 4) alterações na comunicação celular no NSQ (YANNIELLI E HARRINGTON, 2001). Em relação à regulação de genes-e proteínas-relógio, tem sido demonstrado que as alterações na CRF induzidas pelo NPY ocorrem através de mecanismos que envolvem inibição da transcrição dos RNAs dos genes Per 1 e Per 2, cujas

expressões são induzidas por estímulos fóticos e não fóticos (FUKUHARA *et. al.*, 2001; BREWER *et. al.*, 2002). O esquema da **FIGURA 5** retirado de Brewer *et. al.* (2002), resume o modelo proposto para as ações do NPY no sistema circadiano, enfatizando os efeitos inibitórios sobre a expressão de genes induzidos pela luz.

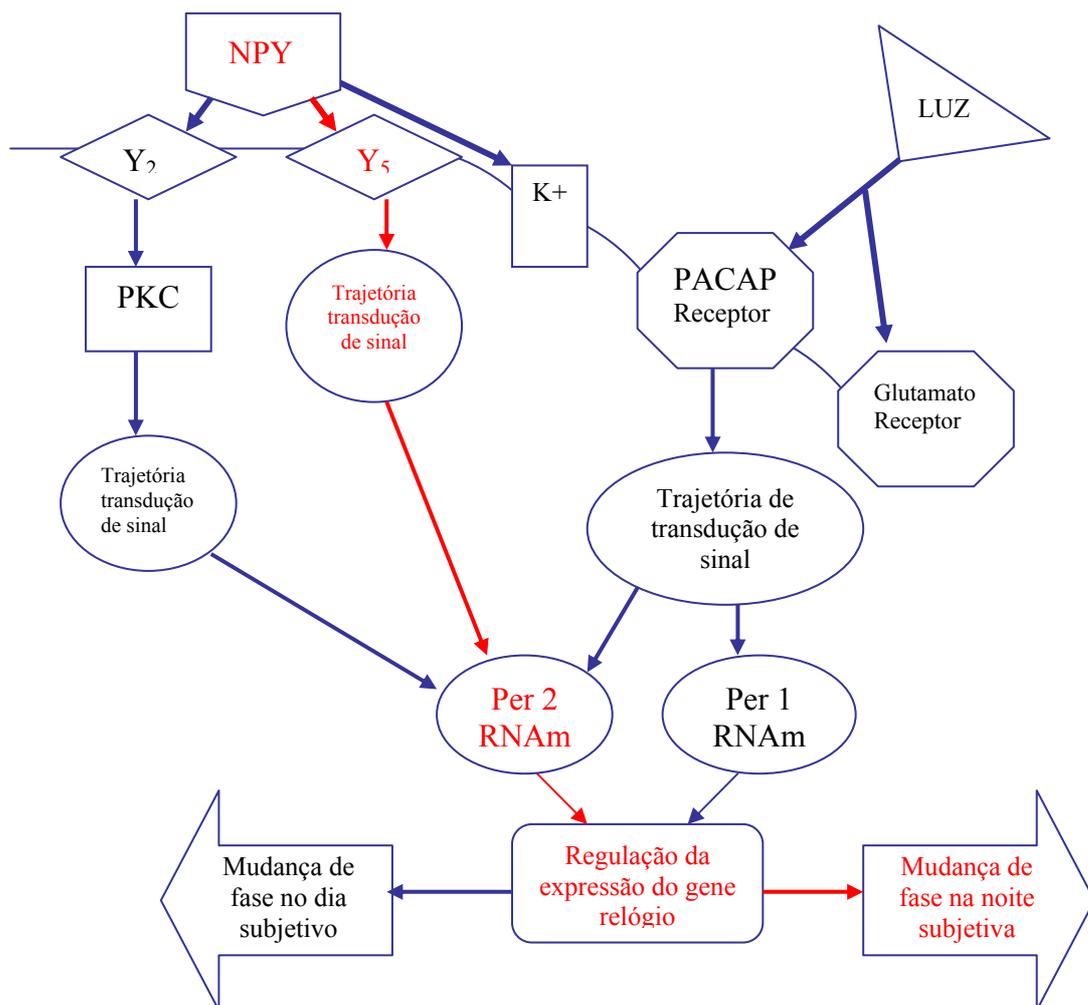


FIGURA 5. Esquema propondo o mecanismo de ação do NPY no STC, enfatizando os efeitos inibitórios da expressão genética induzida pela luz. Modelo proposto por Brewer *et. al.* (2002).

I.4. EFEITOS GERAIS DA MÁ NUTRIÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Vários pesquisadores vêm estudando os efeitos de diversos tipos de má nutrição sobre o sistema nervoso em fases precoces do seu desenvolvimento. Esses estudos têm abordado análise de comportamentos, alterações morfológicas, neuroquímicas, endócrinas e funcionais, no sentido de entender como esta injúria se processa e suas conseqüências, bem como a possibilidade de adaptação do ser vivo a essas questões ambientais (ONIS *et. al.*, 1993; MORGANE *et. al.*, 1993 e BALLABRIGA, 1989).

O adequado suprimento de nutrientes é essencial para o feto por atender a processos básicos de crescimento e diferenciação celular. Os fatores que comprometem o fornecimento de oxigênio e nutrientes para o desenvolvimento do feto são alvo de muitas pesquisas na atualidade dado que o aporte dessas substâncias é essencial para o bom desenvolvimento e desempenho das funções nervosas. O desenvolvimento do cérebro sob aspectos físicos, químicos e fisiológicos responde a interações de fatores genéticos e ambientais. A maturação do SNC e o desempenho ótimo do comportamento dependem de três fatores críticos: 1) hereditariedade; 2) complexidade e grau de estimulação ambiental e 3) nutrição adequada e balanceada (MORGANE *et. al.*, 1993).

A má nutrição representa um insulto ambiental multifatorial uma vez que é capaz de induzir privação social e intelectual (MORLEY e LUCAS, 1997), estresse emocional (SALAS e CINTRA, 1979), relação precária entre mãe e criança (COLOMBO *et. al.*, 1992), sendo que esses fatores agem de maneira sinérgica na inibição do crescimento cerebral. Embora estudos utilizando diferentes paradigmas experimentais de má nutrição indiquem que órgãos vitais como o cérebro e os pulmões sejam relativamente protegidos da redução no crescimento se comparados ao fígado, pâncreas e músculos, dentre outros, deve ser levada em consideração a heterogeneidade das diversas regiões cerebrais em seus cronogramas de desenvolvimento e requerimentos metabólicos (FORBES, *et. al.*, 1978; MORGANE *et. al.*, 1978, ALMEIDA *et. al.*, 2002). Além disto, considerando a questão cultural, potenciais efeitos neurais induzidos por uma nutrição deficiente podem se perpetuar

e podem ser cumulativos sobre várias gerações (DESAI e HALES, 1997; PONTES PESSOA *et. al.*, 2000).

O SNC é vulnerável a mudanças ambientais, especialmente quando elas ocorrem durante o período crítico de desenvolvimento do cérebro. Este período em humanos começa no último trimestre de vida fetal e continua até o 3º e 4º ano de vida pós-natal. Em ratos esse período se inicia na gestação e corresponde principalmente ao período de lactação. Durante esse período, processos de desenvolvimento tais como neurogênese, gliogênese e mielinização apresentam máxima intensidade em diferentes momentos, dependendo da região do cérebro a ser considerada. Também nesse espaço de tempo, as comunicações intercelulares podem alterar o destino das células e estímulos ambientais interferem nessa conectividade possibilitando rearranjos nas ramificações axonais. Amostras quantitativas indicam que dietas inadequadas e falhas no suprimento de matéria-prima e energia para o desenvolvimento do sistema nervoso, podem induzir distorcidas relações entre neurônios e glia, formação pobre dos circuitos neuronais e alterações dos eventos regressivos normais, incluindo morte celular e diminuição da árvore dendrítica, resultando em modificações nos padrões de organização cerebral. Os desvios associados a esse sistema e a gravidade das conseqüências dependem do momento, intensidade e duração do distúrbio nutricional, podendo desencadear efeitos provisórios ou permanentes na morfologia, fisiologia e neuroquímica do sistema nervoso, com alterações funcionais de relevância na esfera cognitiva e no metabolismo do organismo. (MORGANE *et. al.*, 1993; GUEDES *et. al.*, 1996; DESAI e HALES, 1997; ALMEIDA *et. al.*, 2002).

Em países desenvolvidos a má nutrição gestacional é mais freqüente que a pós-natal sendo sua etiologia complexa e pode estar relacionada ao comprometimento da placenta na passagem de nutrientes, assim como o pobre suprimento sanguíneo do feto por alterações dessa placenta, à desnutrição ou doenças maternas e distúrbios genéticos (MORGANE *et. al.*, 1993). Vários autores vêm realçando que a reserva de nutrientes da mãe antes da gravidez é o mais importante fator determinante das conseqüências de uma gravidez com déficit alimentar (DESAI e HALES, 1997). Em países pobres em desenvolvimento, a má nutrição crônica é mais freqüente. As alterações no sistema nervoso, decorrentes de má nutrição crônica, são consideradas como malformações secundárias originadas a partir de interferências no processo normal do desenvolvimento do cérebro. As malformações

podem ser desde pequenas imperfeições ou desvios no programa de desenvolvimento até grosseiras distorções, dependendo do estágio de desenvolvimento do cérebro no qual ocorrem e do tempo de persistência da injúria, podendo provocar uma redução no tamanho e peso encefálicos e induzir alterações na produção celular, no arranjo arquitetônico das células, nas conexões celulares, dentre outros fatores (BALLABRIGA, 1989; DESAI e HALES, 1997)

De modo geral, o desenvolvimento do cérebro obedece a uma seqüência sucessiva de eventos que são regulados por processos intrínsecos (genéticos) e extrínsecos ao cérebro, sendo que qualquer interferência pode acarretar uma cadeia de reações capaz de induzir alterações adaptativas e/ou de amplificar erros funcionais. Para melhor entendimento desses processos de injúrias consideraremos de forma simplificada a organização dos padrões celulares e do desenvolvimento embriológico do cérebro. A histogênese do SNC nos mamíferos pode ser dividida em 3 etapas:

1. Organogênese;
2. Produção neuronal e glial;
3. Migração, diferenciação de neurônios e células da glia e mielinização.

Considerando as várias fases do ciclo celular, é importante observar que efeitos induzidos pela má nutrição crônica podem ocorrer em períodos primários, diretamente sobre as células progenitoras que apresentam elevado nível de síntese de DNA, e no período de proliferação celular quando as linhagens estão se expandindo, o que poderá ocasionar danos mais acentuados, pela interferência no número e densidade de neurônios e células da glia em específicas áreas do cérebro, bem como nas formações nucleares e suas interconexões, o que está diretamente relacionado com a performance neuronal (MORGANE *et. al.*, 1993).

A terceira fase do desenvolvimento corresponde à organização funcional do cérebro, envolvendo os processos de migração, diferenciação, mielinização, formação e eliminação de sinapses, os quais ocorrem de forma interativa com a expressão de moléculas na matriz extracelular e com a estimulação ambiental. Proteínas como as moléculas de adesão das células neurais envolvidas na guia de neurônios e estabelecimento dos contatos célula-célula são expressas primariamente enquanto que as proteínas envolvidas na transmissão sináptica, são desenvolvidas principalmente durante a fase pós-migracional (HATTEN e HEINTZ, 1999). As alterações na relação neurônio/glia podem produzir várias anormalidades podendo

comprometer a capacidade dos neurônios para migrarem e se agruparem dentro de unidades funcionais. Isto é ocasionado por injúrias ocorridas nas células da glia radial que são responsáveis por mecanismos de agrupamento seqüencial de neurônios em colunas que constituirão módulos funcionais (revisão em MORGANE, 1993). Estudos bioquímicos, histológicos e eletrofisiológicos apontam que os processos de gliogênese e de maturação dos oligodendrócitos envolvidos com a mielinização são grandemente comprometidos pela desnutrição em fases precoces da vida pré e pós-natal (ROBAIN e PONSOT, 1978; LAI *et. al.*, 1980; SIKES *et. al.*, 1981; EGWIM *et. al.*, 1986 e SILVA *et. al.*, 1987).

Como foi citado anteriormente, a desnutrição pode induzir uma situação de isolamento social o que acarreta certa privação de estímulos sensoriais e conseqüentemente dificuldades na adaptação às novas demandas ambientais, principalmente no sentido de receber ou utilizar informações externas e de elaborar comportamentos. De uma maneira geral, os estudos que analisaram as interações comportamentais relataram que animais malnutridos durante fases precoces do desenvolvimento do cérebro apresentaram respostas emocionais anormais tendo sido descritos como hiper ativos (WOLF *et. al.*, 1986), agressivos (FRANKOVÁ, 1973), mais responsivos (WHATSON *et. al.*, 1976) e em testes de campo aberto eles apresentam-se mais emotivos, menos exploradores e defecam mais que os controles (SALAS e CINTRA, 1979 e ESCOBAR e SALAS, 1987). Quando expostos a novidades ou situações estressantes eles apresentam níveis mais altos de corticosteróides no plasma do que animais normonutridos (WIENER *et. al.*, 1983).

No entanto, deve ser levada em consideração a capacidade potencial do cérebro para se reorganizar mediante insultos que comprometam o seu funcionamento, ou seja, a sua plasticidade (BUONOMANO e MERZENICH, 1998). O estabelecimento de uma dieta apropriada após um período de má nutrição pode restaurar muitas das injúrias ocorridas, principalmente quando estas não foram severas ou não resultaram em efeitos permanentes sobre os processos de desenvolvimento de neurônios e glia (MORGANE, 1993). Além disso, o enriquecimento ambiental com estímulos sensoriais e psicomotores durante o período crítico de desenvolvimento do cérebro pode minimizar muitos dos efeitos induzidos pela má nutrição. Tais evidências foram observadas tanto em humanos como em animais de laboratório (BALLABRIGA, 1989; COLOMBO *et. al.*, 1992; LIMA *et. al.*, 1992; SANTOS-MONTEIRO *et. al.*, 2000).

Uma consideração importante é a de que a vulnerabilidade das regiões cerebrais aos efeitos induzidos pela má nutrição bem como os potenciais mecanismos de plasticidade não são uniformes, uma vez que cada região do cérebro tem um distinto período crítico e que o surto de crescimento do cérebro como um todo varia de espécie para espécie. Além disso, é possível que os efeitos de uma má nutrição aguda ou crônica envolvam mecanismos distintos de plasticidade e adaptação durante ou após o desenvolvimento do SN (ALMEIDA *et. al.*, 2002).

Vários estudos têm demonstrado que a má nutrição neonatal afeta, predominantemente, regiões neurais que desenvolvem a fase de proliferação celular durante o período pós-natal (FISH e WINICK, 1969; WEST e KEMPER, 1976), tais como córtex cerebral (BASS *et. al.*, 1970; LEWIS *et. al.*, 1975; WEST e KEMPER, 1976), córtex cerebelar (SHARMA *et. al.*, 1987; BALLABRIGA, 1989), hipocampo (DIÁZ-CINTRA *et. al.*, 1991; ANDRADE *et. al.*, 1995) e bulbo olfatório (ALMLI *et. al.*, 1985), sendo relativamente menos vulneráveis as regiões onde a neurogênese ocorre durante as fases mais precoces do período pré-natal. Tais evidências têm sido relatadas inclusive nos diferentes núcleos neuronais de uma mesma região cerebral. Análises eletrofisiológicas e morfológicas obtidas em núcleos talâmicos e nas conexões tálamo-corticais indicam que durante o período crítico de desenvolvimento do cérebro, a má nutrição interfere de forma mais expressiva sobre o desenvolvimento de sistemas multissinápticos não específicos do que sobre vias neuronais específicas (FORBES *et. al.*, 1978; SALAS *et. al.*, 1978). No complexo amigdalóide, Escobar e Salas (1993) evidenciaram que a restrição alimentar durante o período neonatal foi capaz de induzir alterações na arborização dendrítica dos neurônios nos núcleos basolateral e central, mas não no núcleo medial o qual apresenta uma origem ontogenética e uma maturação sináptica precoce em relação aos outros dois núcleos citados. Uma relação temporal similar foi também observada em relação aos efeitos da má nutrição sobre a gliogênese e mielinização. Uma análise comparativa evidenciou que estes processos em estruturas como o corpo caloso e o tracto córtico-espinhal foram significativamente mais comprometidos do que ao longo de vias aferentes somatossensoriais com período de gliogênese mais precoce (ROBAIN e PONSOT, 1978).

I.4.1. Modelo Experimental da Má Nutrição pela Dieta Básica Regional

Os paradigmas experimentais de má nutrição permitem investigar mecanismos estruturais, fisiológicos e bioquímicos do organismo diante de diversidades ambientais envolvendo uma variada gama na disponibilidade de nutrientes essenciais ou não essenciais. Todos os nutrientes, de uma certa forma, influenciam na maturação do sistema nervoso, entretanto as proteínas parecem ser um dos componentes mais importantes para o desenvolvimento das funções neurológicas. A desnutrição protéica pode agir alterando o metabolismo periférico das proteínas por comprometer a disponibilidade de aminoácidos. Muitos aminoácidos são precursores de enzimas, proteínas estruturais, hormônios peptídeos e neurotransmissores e, em muitas instâncias, eles são os próprios neurotransmissores. A barreira materno-placentária em ratos não é efetiva na proteção do feto diante da restrição protéica (MORGANE *et. al.*, 1993). Por essas e outras razões, os modelos de desnutrição a partir de dietas com deficiências específicas de proteínas vêm sendo largamente utilizados. No entanto, o entendimento científico da realidade da desnutrição humana necessita de reproduções fidedignas da mesma para seu estudo.

O modelo experimental de desnutrição induzido pela administração de uma dieta multideficiente, conhecida como Dieta Básica Regional (DBR) do Nordeste do Brasil foi proposto por pesquisadores do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco com base em inquéritos de consumo alimentar na Zona da Mata-sul de Pernambuco (BATISTA FILHO *et. al.*, 1968; COUTINHO *et. al.*, 1976). Análises de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais em ratos alimentados com a DBR vêm sendo realizadas em uma série de estudos (TEODÓSIO *et. al.*, 1990, COUTINHO *et. al.*, 1992; LAGO *et. al.*, 1997; SANTOS-MONTEIRO *et. al.*, 2000; BARRETO MEDEIROS *et. al.*, 2002; PAIXÃO *et. al.*, 2003). Os resultados obtidos em alguns desses estudos indicam que nesses animais, o tipo de má nutrição instalada assemelha-se às características observadas entre crianças pobres da região onde o inquérito alimentar foi realizado (TEODÓSIO *et. al.*, 1990, COUTINHO *et. al.*, 1992; LAGO *et. al.*, 1997). Esta dieta multicarenciada apresenta uma composição de apenas 8% de proteína, porém alta quantidade de carboidratos e

fibras e pequena quantidade de gorduras, vitaminas e aminoácidos essenciais e não essenciais (TEODÓSIO *et. al.*, 1990). Sessenta e cinco por cento (65%) das proteínas da DBR são provenientes de fonte vegetal (feijão) e são proteínas de baixo valor biológico (TEODÓSIO *et. al.*, 1990). Uma análise comparativa entre os efeitos da DBR e de uma dieta com deficiência específica em proteína de alto valor biológico (8% de caseína), evidenciou uma redução significativa induzida pela DBR tanto no ganho de peso corporal das mães durante a gestação como no peso dos filhotes, no dia do nascimento e ao longo do seu desenvolvimento. Essas alterações persistem ou se agravam nas proles descendentes, sendo também observadas no peso do cérebro e de outros órgãos, os quais foram relativamente menos afetados. Além das alterações ponderais foi também demonstrado que a deficiência induzida por essa dieta de forma crônica diminui a longevidade e aumenta os níveis de mortalidade, principalmente nas fases iniciais da vida dos filhotes (LAGO *et. al.*, 1997; PONTES PESSOA *et. al.*, 2000).

Guedes *et. al.* (1987) analisaram o grau de excitabilidade do córtex parietal investigando o fenômeno da depressão alastrante (DA) da atividade elétrica cerebral em ratos mantidos durante a gestação e o aleitamento com DBR e também com diferentes tipos de reposição dos constituintes dessa dieta. Esses autores observaram que a DBR induziu um aumento na velocidade de propagação da DA sendo este efeito não revertido pela suplementação com lipídios, vitaminas, minerais e com um aumento na concentração de proteína derivada dos componentes da dieta. Por outro lado, quando a suplementação da dieta foi feita com a adição de 14% de caseína, os efeitos da desnutrição sobre a DA foram revertidos (ANDRADE *et. al.*, 1990), indicando a importância da qualidade e não da quantidade de proteínas nos efeitos neurais induzidos pela DBR. Alterações metabólicas e neuroquímicas associadas com a desnutrição induzida por essa dieta e os efeitos sobre a DA foram também investigados (revisão em GUEDES *et. al.*, 1996; ROCHA DE MELO e GUEDES, 1997; COSTA-CRUZ e GUEDES, 2001). A maioria desses estudos indica que o caráter multideficiente da DBR altera a responsividade cerebral a agentes inibitórios ou facilitatórios da DA cortical.

Vários trabalhos que investigaram os efeitos de uma administração crônica da DBR desde a fase de gestação, têm apontado alterações no desempenho neuronal de regiões centrais e periféricas. Costa *et. al.* (1983) descreveram um retardo no processo de maturação de reflexos envolvidos com o desenvolvimento do neocórtex,

bem como nos tempos para abertura do canal auditivo, erupção dos incisivos e abertura dos olhos. Cabral Filho *et. al.* (1986) evidenciaram um aumento na susceptibilidade à convulsão induzida por drogas e Silva *et. al.* (1987) descreveram uma redução na velocidade de condução dos impulsos nervosos do nervo ciático. No córtex visual de ratos adultos alimentados com a DBR até 43 dias de idade, a análise de terminais axonais marcados com biocitina evidenciou uma redução no número dos sítios sinápticos potenciais (botões/mm de axônio) e alterações morfométricas transitórias e permanentes foram também observadas em neurônios contendo NADPH-diaforase (PICANÇO-DINIZ *et. al.*, 1998 e BORBA *et. al.*, 2000). Modificações no comportamento agressivo bem como down-regulation dos receptores serotoninérgicos induzido pelo aumento da disponibilidade do neurotransmissor correspondente em ratos albinos adultos (120 dias) foram apontadas como decorrentes da má nutrição induzida pela DBR durante a fase de aleitamento associada à ação de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (BARRETO MEDEIROS *et. al.*, 2002).

O desenvolvimento do sistema GABAérgico e colinérgico na retina de ratos albinos, alimentados com a DBR durante o período de aleitamento, foi analisado por Almeida *et. al.* (2001), os quais evidenciaram um retardo na maturação desses sistemas bem como no processo de morte celular natural (apoptose). Contudo, o estabelecimento do padrão normal ocorreu em P30 de forma similar ao evidenciado em ratos normonutridos.

I.5. EFEITOS DA MÁ NUTRIÇÃO SOBRE O STC

Alguns estudos realizados com o objetivo de analisar os efeitos da má nutrição sobre a organização temporal do comportamento têm indicado uma diferente organização dos ritmos circadianos em animais malnutridos a partir de vários paradigmas experimentais. Um atraso de fase nos níveis plasmáticos de melatonina e nos ritmos de ingestão de água e alimentos foi descrito como decorrente de uma má nutrição calórico-protéica (HEBERT e REITER, 1981) e protéica (HALL *et. al.*, 1978). Uma análise de diferentes padrões comportamentais envolvidos com os estágios de vigília, tais como catação, ingestão de líquidos, ingestão de alimentos,

comportamento exploratório e posturas de repouso características de sono de ondas lentas e sono paradoxal, revelou uma redução na amplitude e média desses comportamentos como o principal efeito induzido por uma dieta pobre em proteínas (6% de caseína) administrada desde o período de gestação (CIPOLLA NETO *et. al.*, 1987). Alguns estudos mostraram que tanto a restrição alimentar como a deficiência protéica na dieta são capazes de alterar os mecanismos homeostáticos e circadianos envolvidos com as fases do sono, provocando uma redistribuição principalmente no sono de movimentos oculares rápidos (sono REM), tanto na fase de claro como na de escuro. (FORBES *et. al.*, 1977; SALAS *et. al.*, 1983; DATTA *et. al.*, 2000; CINTRA *et. al.*, 1988, 2002). Aguilar-Roblero *et. al.* (1997) analisaram a organização circadiana do comportamento de ingestão de água, sob diferentes condições de luminosidade e de ciclo claro-escuro em ratos malnutridos cronicamente a partir da gestação, cujas mães foram submetidas a uma dieta com 6% de caseína a partir de cinco semanas anteriores ao acasalamento. Tais autores observaram que sob condições de ciclo claro-escuro ocorreu uma conversão do padrão comportamental de circadiano para ultradiano, sugestivo de uma dessincronização ou diminuição da responsividade do ritmo endógeno ao ciclo claro escuro ambiental. Recentemente, a análise dos ritmos circadianos de temperatura cortical e de atividade motora, realizada em ratos jovens (média = 55 dias) e idosos (média = 550 dias) submetidos à má nutrição protéica (6% de caseína) até o período de aleitamento, evidenciou que a má nutrição crônica foi capaz de alterar tanto em jovens quanto em idosos, a expressão do ritmo circadiano de temperatura cortical e modificou a relação de fase entre este ritmo e o de atividade motora. (CASTAÑÓN-CERVANTES e CINTRA, 2002).

Todas as alterações observadas nesses estudos levantaram a hipótese de que a má nutrição pode alterar a expressão da ritmicidade circadiana por comprometer os processos de sincronização ao ciclo claro-escuro, a força de acoplamento entre os osciladores e a transmissão de ritmicidade para os efetores, sem, contudo, afetar o período endógeno dos osciladores (AGUILAR-ROBLERO *et. al.*, 1997). Há a sugestão de que a má nutrição pode afetar estruturas envolvidas com o STC como o NSQ e/ou suas projeções aferentes e eferentes (KENNAWAY, 2002), uma vez que as mesmas se desenvolvem durante os períodos de gestação e aleitamento, o que pode torná-las vulneráveis às influências maternas que podem afetar o desenvolvimento do sistema nervoso. Nesse aspecto, dois estudos adotando a má

nutrição protéica crônica (6% de caseína) cinco semanas antes do acasalamento foram feitos: Cintra *et. al.* (1994) descreveram uma redução no tamanho de três tipos de células do NSQ em ratos jovens de 30, 90 e 220 dias de idade e Aguilar-Roblero *et. al.* (1997) relataram uma diminuição no número e densidade de células imunorreativas ao VIP, VP e GFAP no NSQ de ratos adultos (110 dias de idade) embora esses grupos celulares tenham mantido sua distribuição anatômica. Neste último estudo foi também evidenciada uma redução de 8% na expressão de serotonina em terminais neuronais provenientes dos Núcleos da Rafe e nenhuma alteração nas terminações neuropeptidérgicas provenientes do FIG. Diante desses dados, Aguilar-Roblero *et. al.* (1997) sugeriram que as fibras aferentes para o NSQ foram menos afetadas pela má nutrição provavelmente devido a uma maior arborização dos terminais sinápticos que aferem para o NSQ como um mecanismo plástico compensatório diante de uma potencial perda neuronal. Entretanto, nenhuma análise da organização do FIG em animais desnutridos tinha sido feita para testar essa hipótese.

I.6. HIPÓTESES

A maioria dos estudos relacionados com os efeitos da má nutrição sobre o STC foi realizada com paradigmas experimentais correspondentes à restrição alimentar ou à deficiência específica de uma proteína de alta qualidade como a caseína. Nenhuma análise de possíveis alterações no STC foi realizada com o uso de uma dieta multideficiente. Como já mencionado anteriormente, a composição multideficientária da DBR caracteriza-se pela sua pobreza em vitaminas, minerais, lipídeos e pela baixa qualidade e quantidade de proteínas, sendo todos estes elementos nutricionais de fundamental importância para o desenvolvimento do sistema nervoso bem como para a estabilidade funcional e nível de excitabilidade das membranas celulares tanto neuronais como gliais. Alterações significativas no início, progressão e capacidade de mielinização no cérebro de ratos foram descritas como muito mais acentuadas diante de uma dieta com 8% de proteína vegetal (proteína da soja) do que uma com 8% de caseína (EGWIM *et. al.*, 1986). Portanto, a nossa

primeira hipótese é a de que a desnutrição crônica induzida pela DBR possa representar um insulto severo durante o desenvolvimento de componentes neurais do STC.

Considerando a hipótese levantada por Aguilar-Roblero, (1997) de que a má nutrição crônica e severa pode alterar a expressão da ritmicidade circadiana por comprometer os processos de sincronização ao ciclo claro-escuro, a nossa **segunda hipótese** é a de que mudanças no número de células ganglionares da retina e/ou nos terminais da projeção retino-hipotalâmica, possam estar envolvidas com estas alterações.

A nossa **terceira hipótese** neste trabalho é a de que a desnutrição crônica possa intervir na neurogênese e diferenciação dos neurônios imunoreativos À NPY do Folheto Intergeniculado do Tálamo.

I.7. OBJETIVOS

1.7.1. OBJETIVO GERAL

Investigar, no rato albino, se a má nutrição induzida por uma dieta multideficiente é capaz de alterar o desenvolvimento normal de componentes neurais do sistema de temporização circadiana, analisando a retina, o núcleo supraquiasmático do hipotálamo, o folheto intergeniculado do tálamo e as conexões estabelecidas por estas regiões.

1.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da má nutrição crônica induzida pela Dieta Básica Regional (DBR) a partir da gestação ou do aleitamento, sobre a organização de especializações neurais na retina de ratos jovens, analisando a distribuição topográfica de densidade e o espectro de tamanho de neurônios ganglionares em animais com as idades de 27, 30 e 60 dias.

- Analisar as dimensões do núcleo supraquiasmático e a distribuição nesse núcleo dos terminais neuronais do tracto retino-hipotalâmico em ratos malnutridos pela DBR, a partir da gestação ou do aleitamento até a idade de 30 e 60 dias.
- Averiguar se a má nutrição crônica pela DBR é capaz de alterar parâmetros fenotípicos de neurônios imunorreativos ao NPY no Folheto Intergeniculado do tálamo em ratos de 30 e 60 dias.
- Analisar no NSQ de ratos malnutridos pela DBR a distribuição de terminais neuronais do tracto genículo hipotalâmico imunorreativos ao NPY, em animais de 30 e 60 dias.

**DIFFERENTIAL VULNERABILITY OF THE RAT RETINA,
SUPRACHIASMATIC NUCLEUS AND INTERGENICULATE LEAFLET TO
MALNUTRITION INDUCED DURING BRAIN DEVELOPMENT**

M. C. R. Vilela¹, J. E. F. Mendonça¹, H. Bittencourt¹, R. M. Lapa¹, M. L. M. Alessio¹, M. S. M. O. Costa³, R. C. A. Guedes², V. L. Silva¹, B. L. S. Andrade da Costa^{1*}

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas,

²Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil.

³Departamento de Morfologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

Running head: Malnutrition and circadian timing system

Corresponding author:

Dr. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Laboratório de Neurofisiologia

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Centro de Ciências Biológicas, CCB- UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária

50670901 Recife, PE, Brasil.

Phone: 55-81- 21268530 FAX: 55-81-21268500 or 21268350

E-mail: bl@ufpe.br

ABSTRACT

We investigated in young rats the effects of malnutrition on the main structures of the circadian timing system: retina, hypothalamic suprachiasmatic nuclei (SCN), thalamic intergeniculate leaflet, retinohypothalamic- and geniculohypothalamic tracts. Control rats were born from mothers fed a commercial diet since gestation, and malnourished rats from mothers fed a multideficient diet since gestation (GLA group) or lactation (LA group). After weaning, pups received the same diet as their mothers, and were analysed at postnatal days 27, 30-33 and 60-63. Brain sections were processed to visualise in the SCN neuropeptide Y immunoreactivity and terminal labeling after intraocular tracer injections. Nissl staining was used to assess cytoarchitectonic boundaries of the SCN and cell features in retinal whole mounts. Cell counts, morphometric and densitometric analysis were performed. Compared with controls, the total retinal surface was reduced and the topographical distribution of retinal ganglion cells was altered in malnourished rats, with changes in their density. Alterations were also detected in the SCN dimensions in the GLA and LA groups at one and two postnatal months, as well as in the SCN portion occupied by the retinal input in the GLA group at days 30-33, but not in the NPY-containing geniculohypothalamic tract. The present data point to subtle changes, with a low and differential vulnerability to early malnutrition, of structures involved in circadian timing regulation. Furthermore, the present findings suggest that the altered circadian rhythmicity previously documented in malnourished rats cannot be ascribed to impaired development of the retino- and geniculohypothalamic projections to the SCN.

Keywords: Circadian timing system, nutrition, retinohypothalamic tract, geniculohypothalamic tract, retinal ganglion cells, neuropeptide Y.

INTRODUCTION

The problem of infant malnutrition raises growing interest, and several studies have aimed to define the relationship between nutritional status and cell growth or maturation in the brain. These studies have indicated a marked vulnerability of the developing nervous system to changes in the environment, particularly when these changes occur during the so-called “brain growth-spurt period” [44,58,74]. In humans, this corresponds to the period between the last trimester of fetal life and the third postnatal year. In the rat, this period corresponds to the first three postnatal weeks, i.e., the lactation period, when developmental phenomena such as neurogenesis, gliogenesis and myelination peak, though at different times depending upon the brain region. Malnutrition may alter brain histogenesis, causing a variation of the proliferation rates of neural and glial progenitor cells, and can induce alterations in the regulation of several neurotransmitters [1,9,17,46,63,65]. Such alterations vary in different brain regions and lead to adaptive changes in metabolic and behavioural patterns [4,26,55]. Therefore, the alterations induced by malnutrition can variably dissociate brain structure from its function. The severity of the effect depends upon the timing, intensity and duration of the nutritional disturbance [32, 55].

The brain circadian timing system acts as a multioscillatory device, playing a key role in the adjustment of the animal to its environment. The suprachiasmatic nucleus of the anterior hypothalamus (SCN) and the thalamic intergeniculate leaflet (IGL) are important components of this system involved in photic and non-photoc information processing, used to entrain behavioural and physiological responses to exogenous cues. The timing of the endogenous pacemaker localised in the SCN is synchronised to the external light-dark cycle. This is achieved primarily through information relayed to the SCN directly from the retina via the retinohypothalamic tract (RHT), and indirectly from the IGL, i.e. via the geniculohypothalamic tract (GHT), which contains neuropeptide Y (NPY). The GHT- and serotonergic projections from the raphe nuclei are also believed to convey behavioural entraining input to the SCN. Efferent projections of the SCN transfer rhythmicity to centers subserving the regulation of endocrine, autonomic and behavioural functions (reviews in [29,39,50,51,76]).

Studies carried out to analyse the effects of malnutrition on the temporal organisation of behaviour have pointed out alterations of circadian rhythms in malnourished rats. A phase delay was reported in the rhythm of food- and water intake [34] and in the plasma level of melatonin [35]. A cosinor analysis of behavioural patterns, such as grooming, drinking, eating, exploring, curling up and lying down, revealed a reduced amplitude and mesor in malnourished rats during early life [21]. Using different nutritional paradigms, several studies have demonstrated alterations induced by malnutrition on the synchronisation of circadian and homeostatic mechanisms driving sleep, especially rapid-eye-movement sleep [18,19,25,30,66]. Aguilar-Roblero *et al.* [2] analysed the circadian organisation of drinking behaviour under different lighting conditions, and observed a splitting of the rhythmicity under the light-dark cycle in chronic malnourished rats. Long-lasting alterations in the circadian rhythm of cortical temperature oscillation were also detected after chronic protein malnutrition [16].

The changes observed in the studies mentioned above suggested that malnutrition may affect the expression of circadian rhythmicity in processes such as entrainment to light-dark cycles, coupling among oscillators or transmission of rhythmicity to the effectors [2]. According to this hypothesis, malnutrition may affect the structures involved in the circadian timing system, such as the SCN and/or their afferent and efferent projections [41]. To our knowledge, only two studies, adopting chronic low-protein malnutrition (6% casein) from 5 weeks before mating, have been carried out so far on this subject. Cintra *et al.* [20] reported a reduction in the size of three cell types in the SCN, especially in young rats at the age of 30 days. Aguilar-Roblero *et al.* [2] observed a decrease in the number and density of cells immunopositive to vasoactive intestinal polypeptide, vasopressin and glial fibrillary acidic protein in the SCN of adult rats of 150 days of age. The latter study [2] also described in the SCN a 8% reduction in the number of afferent fibres containing serotonin, while no difference was observed in the NPY-containing axon terminals deriving from the GHT. However, the organisation of the IGL and RHT has not been analysed so far in malnourished animals.

The aim of the present study was to investigate in young rats whether chronic malnutrition induced by a multideficient diet from gestation or lactation could alter the development of components of the circadian timing system involved in the entrainment of

physiological responses to the light-dark cycle. The multideficient diet adopted in the present study is called the “regional basic diet” (RBD) and has been used as experimental model of malnutrition in several studies on its neural effects [3,13,32,33,61,73]. RBD is rich in carbohydrates and fibres but poor in vitamins, minerals, fats, and contains a low concentration of proteins, which derive predominantly from vegetables. RBD reproduces, in this latter aspect, the diet common in malnourished human populations of several developing countries. The RBD-induced malnutrition can lead to significant alterations in physiological [7,52,59], metabolic, and behavioural parameters [10,24,42,62,73]. Considering the RBD protein deficiency, both in quantity and in quality, we hypothesised that chronic malnutrition induced by this diet could affect the neurogenesis or development of retinal ganglion cells or IGL neurons containing NPY, or induce plastic changes in the terminal fields of the RHT or GHT in the SCN. By using anterograde axonal tracing combined with Nissl staining and immunohistochemical approaches, we evaluated the pattern of organisation of retinofugal terminals and the size of the SCN, retinal ganglion cell density, and the NPY immunoreactivity pattern of GHT fibres in the IGL and SCN.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

A total of 168 Wistar rats of both sexes, obtained from 28 litters (6 pups per litter), were used. The maintenance and use of experimental animals complied with the principles regarding the care and use of animals of the Society for Neuroscience and the ethical requirements approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the *Centro de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Pernambuco*. The rats were kept on a 12 h light/dark cycle (lights on 6:00 h) and divided into three groups under different nutritional conditions: control rats (C), rats malnourished since gestation (GLA), and rats malnourished since lactation (LA). The control animals were born from mothers fed a commercial lab chow diet containing 22% of a mixture of animal and soy protein (Agribands Purina do Brasil) from the time of mating. After weaning on postnatal day (P) 25, the male and female control rat pups were separated and fed *ad libitum* with the same diet as the mothers. Malnourished rats were born from mothers fed with the RBD,

containing only 8% proteins in a 5:3 proportion of vegetal to animal proteins [73]. Briefly, the diet was prepared with beans (*Phaseolus vulgaris*), manioc flour (*Manioc esculenta*), sweet potato (*Ipomoea batatas*) and dried-salted meat (for details see [73]). The composition of this diet is shown in Table 1.

The mothers of the GLA group received the RBD diet during the periods of mating, gestation and lactation, while the mothers of the LA group received it only during lactation. After weaning (P25), male and female pups of both malnourished groups were separated and kept receiving the same deficient diet *ad libitum*.

In each group, animals were sampled randomly from different litters and housed three per cage in a room maintained at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ with 67% relative air humidity. They were analysed at three ages: P27 ($n = 6$ per group), P30-33 ($n = 24$ C, $n = 28$ GLA, $n = 23$ LA) and at two months (P60-63; $n = 26$ C, $n = 27$ GLA, $n = 17$ LA).

Intraocular tracer injections

The analysis of the RHT was performed using the anterograde axonal transport of cholera toxin subunit B (CTb). Considering that the RHT of well-nourished rats reaches the adult pattern at P30 [72], we analysed animals at this age in order to investigate whether malnutrition could alter the development of this tract. The animals (9 females and 6 males) were anaesthetised with sodium pentobarbital (Crystalia^R, São Paulo, Brazil; 30-40 mg/Kg, i.p. for malnourished rats and 60-80 mg/kg, i.p. for control ones) and subjected to unilateral intraocular injections of CTb (List Biological Laboratories, Inc., Campbell, CA). The volume of CTb injections differed according to the eye size of the animals. Injections of 10 μl (for malnourished rats) and 15 μl (for control rats) of a 1 mg/ml aqueous CTb solution were made into the vitreous body using a 0.3 ml syringe. After injection, the needle was left in place for a few minutes to minimize reflux of the solution. Immediately after the injection procedure, the animals were returned to their cages to recover from anaesthesia. Post-injection survival times ranged from 3 to 5 days.

Perfusion

At the time of sacrifice, the rats were again anaesthetised with sodium pentobarbital (40-60 mg/Kg, i.p. for malnourished rats and 60-80 mg/kg, i.p. for control ones) and

perfused transcardially first with saline (0.9% NaCl) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4 (PB). Perfusion was always performed between 12:00 and 18:00, with a continuous infusion pump (Harvard equipments) through a cannula inserted into the left ventricle. Perfusion rates were 3.82 and 7.64 ml/min for malnourished and control rats, respectively. The volume of saline and fixative differed according to the body weight of the animals (20 ml saline and 200 ml fixative for malnourished rats and 50 ml saline and 400 ml of fixative for control rats). After perfusion, the brains were dissected out from the prefrontal cortex to the inferior limit of the brainstem (the olfactory bulb, cochlea and spinal cord were excluded). They were then postfixed for 2 h in the same fixative, rinsed in PB and weighed (wet weight). Subsequently, the brains were cryoprotected in solutions of 10%, 20% and 30% sucrose in PB. The same perfusion procedure described above was adopted for control and malnourished animals at P30-33 and P60-63, which were used to analyse NPY immunoreactivity in the IGL and SCN.

Immunohistochemical procedures and Nissl Staining

Brain blocks were serially cut on a freezing microtome (Leitz Wetzlar) into 50 μ m-thick sections in the coronal plane, throughout the rostrocaudal extent of the diencephalon. All sections were collected serially in PB and arranged in two series. The atlases of Paxinos and Watson [60], and Sherwood and Timiras [68] were used to delimit cytoarchitectonic regions. The series of sections used for immunohistochemistry was first treated with 0.01 M citrate buffer, pH 6.0, at 60⁰C for 2 h. Thereafter, free-floating sections were rinsed in PB several times. In order to reveal the presence of CTb or NPY, the avidin-biotin-peroxidase (ABC) protocol was adopted. Sections were incubated with polyclonal rabbit anti-CTb antiserum (Sigma, St. Louis, MO) diluted 1:5,000 in PB containing 0.3% Triton X-100 (PBX) and 2% normal goat serum (NGS) for 48 h at 4⁰C. Sections processed to visualise NPY immunoreactivity were pre-incubated in 10% NGS followed by polyclonal rabbit anti-NPY antiserum (Sigma) diluted 1:8,000 in PB containing 1% NGS for 48-72 h at 4⁰C. The sections were then incubated for 1.5 h in secondary antiserum (biotinylated goat anti-rabbit IgG; Vector Labs, Burlingame, CA) diluted 1:200 in PBX, and processed for immunoperoxidase staining using the ABC complex (Standard ABC kit, Vector Labs). The binding of antibodies was revealed by the addition of diaminobenzidine tetrahydrochloride

0.05% (Sigma) and 0.01% H₂O₂ in PB, for 10 min. Subsequently, the free-floating sections were rinsed in PB and mounted on gelatin-coated slides. These procedures were carried out simultaneously in brain sections from control and malnourished animals. As for the control of the staining specificity, some sections were subjected to the immunohistochemical procedure omitting the primary antiserum. A minimum of five animals per group were studied using each antibody. The series of sections used to analyse the cytoarchitectonic boundaries of the suprachiasmatic nucleus were processed by Nissl staining with 0.25% cresyl violet, according to a previously described protocol [71].

Retinal whole mount preparation and Nissl staining

Considering that during rat development the refinement of the RHT occurs between P25 and P30 [72], we choose to analyse the retina at an intermediate day of this period (P27), as well as at P30-33 and P60-63. Immediately after perfusion, the eyes of C, GLA and LA animals at P27 or P30-33, and of C and GLA animals at P60-63 were enucleated and the retinae dissected in PB. Prior to enucleation, marks were made on the temporal side to aid subsequent identification of the superior and inferior margins of the retina. Each retina was processed as a whole mount on gelatine-coated slides; Nissl staining was obtained with 0.25% cresyl violet. Whole mount preparation and Nissl staining were done according to a previously described protocol [71]. In order to estimate the shrinkage due to perfusion, 6 retinal whole mounts were processed from eyes enucleated before fixation and others immediately after saline perfusion, and then compared with the contralateral eyes subjected to paraformaldehyde perfusion. The percentage of shrinkage due to perfusion and histological processing was estimated by scanning all retinal whole mounts after each step. The area of each scanned image of the retina was evaluated using the software Scion Image for Windows. Retinae with overall shrinkage higher than 10% were excluded from analysis. Low power drawings (10x), obtained from the outline of each retina, were used to locate the sampling areas in which the ganglion cells were counted.

Data analysis

A Leica DMLS microscope coupled to SAMSUNG high level colour camera (model SHC-410NAD) was used to obtain digital images from brain sections and retinal whole mounts.

Images from the SCN immunoreacted for CTb or NPY, or stained with cresyl violet, were obtained with a 4x microscope objective; the IGL was analysed with a 20x objective, and a high power objective (100x) was used for ganglion cell counting in Nissl-stained retinal whole mounts. Care was taken to obtain the digital images using the same light intensity conditions.

Analysis of the retina

The counts of ganglion cells were performed in 0.5-1 mm steps across the entire retina. The number of sampling areas (frame size = 0.015 mm²) varied with the retinal size. In GLA and LA animals at P27-33, the counts were performed in 16-18 and 22-25 regions of interest, respectively, while in the matched control group the cell counts were made in about 28-30 regions of interest. At P60-63, the number of regions of interest varied from a minimum of 25 in the GLA group to a maximum of 50 in the C group. The criteria and protocol described by Stone [71] were adopted to distinguish ganglion cells from neuroglia and from other neuron types found in the ganglion cell layer, as well as to construct isodensity lines based on the cell counts. Considering that in some instances it is very difficult to be sure whether a certain small cell body actually is a ganglion cell or a displaced amacrine cell, all cells identified as neurons were counted. In each group, the topographical distribution of neurons in the ganglion cell layer was analysed in at least 6 retinae from different animals.

Morphometric analysis in brain sections

Cell body area and diameter of NPY-immunoreactive neurons in the IGL were measured using the software Image Lab 2000[®] (Roberto Carneiro Barro, Brazil), delimiting the outlines of cell somata, in those cases in which the cell nucleus could be clearly identified. These measurements were made in 6 animals per group, in the right and left IGL of about 4 sections per animal. In the IGL, a minimum number of 50 and a maximum of 100 cells were set to be analysed. In Nissl-stained and NPY- or CTb-immunoreacted sections through the hypothalamus, the quantitative analysis of the SCN was performed in sections through the middle level of this nucleus, identified as corresponding approximately to anteroposterior (AP) – 1.3 mm from bregma [60]. The software Image Lab 2000[®] was

used for densitometry analysis, area- and diameter measurements of the SCN region occupied by RHT- and GHT axon terminals, and also for the evaluation of the SCN cytoarchitectonic boundaries. In the evaluation of the area of retinal terminals in the SCN, the sparse CTb labeling outside the cytoarchitectonic boundaries of the SCN was excluded from the analysis. Considering that no gender-related difference was found in the cytoarchitectonic boundaries defined by Nissl staining, the data of CTb immunoreactivity were analysed in 3 females and 2 males per group.

Statistical analysis was carried out using the Student *t*-test, Student-Newman-Keuls test and analysis of variance (ANOVA), followed by the *post-hoc* Tuckey test when appropriate. Statistical significance was accepted at the 95% confidence level ($\alpha = 0.05$) for comparison between control and malnourished groups.

RESULTS

Body and brain weights

The body weights of the GLA group differed from those of the LA group at P30-33 and P60-63. Compared to the respective controls, malnourished groups showed a remarkable reduction in body weight. Such reduction ranged from 65% (in the GLA group at P30-33, and in the LA group at P30-33 and P60-63) to 80% (in the two month-old animals of the GLA group). In contrast to the controls, no gender-related differences were detected in the body weights of the malnourished groups. A significant difference, which also was not gender-related, was observed in the brain weights between GLA- and LA rats at both age ranges (*t*-test; $p < 0.05$). In both malnourished groups, the brain weights were significantly lower than those of the corresponding control groups, ranging from 68% of control values in the GLA group at 60-63 days to about 82% in the LA group at 30-33 days. Data on body and brain weights are presented in Table 2. As it also can be seen in Table 2, the brain weight/ body weight ratio ranged from 0.7% to 5% and was higher in the GLA group at 30 days of life.

Dimensions of the suprachiasmatic nucleus

Table 3 shows absolute mean values of morphometric parameters determined in the SCN of control and malnourished animal groups. Since no gender-related differences were detected in SCN dimensions, intergroup comparisons presented in Table 3 included the total number of animals per group. The GLA group values were significantly lower than those of the LA ones (*t*-test; $p < 0.05$) or control groups (*t*-test; $p < 0.001$) at both ages analysed. A 20% reduction in the SCN mean area was observed in the GLA group at P30-33 and P60-63 (*t*-test, $p < 0.005$), compared to their control counterparts. In LA group, such reduction was less pronounced (10%), but still significant at both ages analysed (*t*-test, $p < 0.05$). Figure 1 depicts digital images of representative Nissl-stained sections through the SCN in animals of the GLA, LA and C groups at 30 and 60 days. As it can be seen in Fig. 1, a reduction in the vertical and horizontal axes of the SCN occurred mainly in the rats malnourished since gestation.

Retinohypothalamic tract

In addition to the alterations of the SCN dimensions in the malnourished groups, in 33-35 days old GLA rats in which the intraocular injections were carried out at P30, a significant reduction (about 20%) was observed in the SCN-area occupied by RHT axon terminals, as compared to the control- and to the LA groups (Student-Newman-Keuls test; $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) (Table 3). Despite this reduction, the intensity of CTb-labeling, as evaluated from relative optical density, was similar in the SCN of GLA animals (21.93 ± 3.28 , $n = 5$), as compared to control ones (22.72 ± 4.43 , $n = 5$). No significant difference in the SCN area occupied by RHT axon terminals was detected between the LA and C groups. Figure 2 shows digital images of representative sections immunoreacted for CTb in the GLA, LA and C groups at P33.

Retinal dimensions

Malnourished rats at 27 days of age exhibited a significant reduction of about 30% in the total retinal surface in the GLA group ($27.34 \pm 2.09 \text{ mm}^2$; $n = 6$) and 20% reduction in the LA group ($33.93 \pm 2.19 \text{ mm}^2$; $n = 6$), compared to the corresponding control group ($41.01 \pm 1.27 \text{ mm}^2$; $n = 6$). At P30-33 and P60-63, malnutrition-induced reduction in the

retinal surface area was still significant. In the GLA group, a 30% deficit persisted at P30-33 ($31.93 \pm 3.27 \text{ mm}^2$; $n = 6$) and increased to about 38% at P60-63 ($36.77 \pm 3.77 \text{ mm}^2$; $n = 9$), compared to the respective controls ($45.18 \pm 4.89 \text{ mm}^2$; $n = 13$ and $59 \pm 2.64 \text{ mm}^2$; $n = 6$ at P30-33 and P60-63, respectively). In the LA group a reduction of 20% was also found at P60-63 ($44.38 \pm 4.2 \text{ mm}^2$; $n = 6$) compared to control animals.

Topographical distribution of retinal neurons in the ganglion cell layer

In the C group at 27 or 30-33 days, the ganglion cell density ranged from 2,000-2,500 cells/mm² in peripheral regions of the retina to a maximum of 5,500-6,200 cells/mm² in a region at the superior temporal quadrant near the optic disc, as shown in Figs. 3A and 3B for a representative retina of an animal at P30.

In retinal whole mounts of GLA rats at P27 or P30-33, the lowest cell density ranged from 3,700 to 4,000 cells/mm² in the peripheral retina, and the highest density corresponded to 5,800-5,900 cells/mm² in central regions near the optic disc (Fig. 3C,D shows representative retinæ of animals at P30). This represented a lower centre-peripheral gradient of cell density when compared to control retinæ. In the GLA group, a cell density of 4,200 cells/mm² was observed over a large extent of the retina. At P60-63 a slight decrease in the ganglion cell density was detected in far peripheral regions of the retina, where 2,500-3,000 cells/mm² was estimated as lowest density.

In the LA group at P27 or P30-33, the lowest and highest retinal cell density ranged between 3,000-3,500 and 5,700-6,000 cells/mm², respectively. Such values corresponded to a slight increase in the centre-peripheral gradient of cell density compared to that observed in the GLA group. In most of the retinal tissue however, the isodensity values were still higher than those observed in control rats (Fig. 3E,F shows representative retinæ of animals at P30). Figure 4 shows the ganglion cell layer in the central and peripheral regions of control and GLA rats at 30 days of age.

NPY immunoreactivity in the intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus

No difference in the NPY immunoreactivity pattern in the IGL was observed between males and females or between control and GLA groups at both ages analysed. NPY-containing neurons were observed throughout the rostrocaudal extent of the IGL and

exhibited oval or fusiform perikarya and primary dendrites. Figure 5 illustrates digital images of coronal sections at the rostral level of the IGL in control and GLA rats at P30.

The size of NPY-immunoreactive somata did not differ significantly between control and malnourished animals (ANOVA, $F(5.45) = 11, p = 2.42$). No significant difference was observed between males and females in each group. Table 4 summarises the average cell soma areas and diameters obtained in 6 females of the control and GLA groups ($n = 400$ cells per group) at P30-33. The areas and medium diameters of cell bodies ranged from about 50 to 150 μm^2 and 9 to 15 μm , respectively, in both groups, showing a similar and normal distribution, characterised by an increased proportion of cells with a soma area of about 80-100 μm^2 . In the control ($n = 2$) and GLA ($n = 2$) animals in which the analysis of cell size was made in 100 cells, the results were not different from those obtained in the other animals, in which 50-52 cells had been measured.

The distribution of NPY-containing fibres in the SCN was not altered by the RBD-induced malnutrition during brain development. At both P30-33 and P60-63, a NPY-immunoreactive dense fibre plexus was found predominantly in the ventral region of the SCN, with sparse fibres extending in the remaining portion of these nuclei. The total area and mean diameter of the region occupied by NPY-containing terminals in the SCN did not differ significantly between malnourished and control animals, or between males and females of each group at P30-33 and P60-63 (Table 4). Figure 6 shows digital images of sections at the middle level of SCN in control and GLA rats at 30 and 60 days.

DISCUSSION

Susceptibility of the circadian timing system to malnutrition during development

According to previous data, low-protein malnutrition or feeding restriction can modify the temporal organisation of several behavioural and physiological parameters, especially by inducing a splitting in circadian rhythms and lack of synchronisation of endogenous responses to environmental time cues (e.g., [2,16,21,25,43]). In the present investigation we hypothesised that a multideficient diet administered early in life could affect the structure of some components of the circadian timing system involved in the entrainment of physiological responses to the light-dark cycle. It was expected that the

RBD could induce at least a developmental delay and alterations in the neuronal organisation of the retina, SCN and IGL, with potential effects on the RHT and GHT. The results herein reported support the assumption that RBD, the nutritional paradigm we adopted, induces severe malnutrition in the experimental subjects, especially affecting body growth as compared to brain growth. The data also point out a low and differential vulnerability of retina, SCN and IGL to severe malnutrition during the critical period of brain development, with subtle changes in these structures. In particular, as it will be described below, we could document in the malnourished rats a reduction of retinal surface and changes in retinal ganglion cell distribution, as well as alterations in the SCN dimensions and extent of the RHT terminal field in the SCN.

Changes in the retina after early malnutrition

A 38% maximal reduction of the total retinal dimension was observed in malnourished rats. Alterations were more pronounced in the GLA group than in the LA group, being greater at P60-63 than at previous time points. Thus, the retinal surface area of the GLA group did not increase proportionally to body weight gain, suggesting an impaired normal growth of the eye due to the multideficient diet. In fact, in all malnourished rats analysed in the present study, a decrease in the eye dimensions, including their axial diameters (data not shown), was observed.

In the retina, in control animals at P27-33 the topographical distribution pattern of isodensity lines and the peak of cell density were similar to those previously described in adult albino rats [31,38]. In peripheral regions of the ganglion cell layer, the density values estimated in the present study were highest than those previously described (e.g. Fukuda [31] reported in adult rats a range from 1,000-1,500 cells/mm²).

The main difference found in the malnourished rats, as compared to the control at P27-33 was represented by a decrease in the centre-peripheral gradient of cell density and a poor definition of an *area centralis*, described as a functional specialisation of the rat retina [31,38]. In our study, the peak of cell density in the central retina ranged from 5,800 to 6,200 cells/mm², and did not differ between malnourished and control rats. Therefore, the reduction of the cell density gradient seemed to be mainly due to relatively high cell density in midperipheral and peripheral regions of the retina of malnourished rats.

At least three aspects are of interest concerning the discussion of retinal alterations induced by malnutrition. First, in rats a postnatal retinal growth during the lactation period is more evident in the peripheral regions than in central ones, which is an important feature involved in the centre-peripheral gradient of ganglion cell density [48]. Second, the neurogenesis of retinal ganglion cells occurs between embryonic days (E) 14 and E20, but cells of the central regions mature and reach their targets earlier than those generated in peripheral regions [54,64,69]. Third, the density and total number of ganglion cells are also determined by programmed cell death phenomena. It has been estimated that at birth the rat retina contains about 120,000 ganglion cells, but such number is reduced by apoptotic mechanisms, first in central and then in peripheral regions, predominantly during the first postnatal week [37]. In RBD-malnourished rats during the lactation period, analysis of pyknotic cell profiles in retinal transverse sections did not show differences in the percentage of cell death in the ganglion cell layer between P8 and P30 [3]. No similar analysis was performed in rats malnourished since gestation, or in retinal whole mounts, and future studies are needed to address these issues.

Data collected in the present study suggest that severe malnutrition affects the growth rate of the peripheral retina, contributing to a higher cell density in this region. A reduction in the cell body size in the ganglion cell layer was previously reported in retinal transverse sections of RBD-malnourished rats during lactation [4]. Thus, our results indicate that the RBD induces in the ganglion cell layer a cell packing effect similar to that described for other regions of the malnourished brain [13,56]. As it is well known, the morphological features of ganglion cells can provide indications on their neural activity and function. Further studies are needed to verify whether SCN-projecting ganglion cells, especially those located in peripheral retinal regions, are affected by the cell packing effect observed after RBD-induced early malnutrition.

The greater effect observed in the retina of the GLA group compared to the LA group, at both ages analysed, indicated that alterations were proportional to the severity and period of malnutrition during retinal development. Conversely, data also indicate a relative “sparing” of retinal ganglion cells during this type of insult.

Changes in the SCN

A reduction of about 20% and 10% in the SCN dimensions was observed in GLA and LA animals, respectively, as compared to controls at one and two postnatal months. Such results suggest that the observed alterations were proportional to the reduction in the brain dimensions of these malnourished rats, or that the genesis or differentiation of neurons or glial cells in the SCN were affected by the RBD-induced malnutrition.

The changes detected in the SCN of the GLA group seem to be coherent with a significant reduction in the size of neuronal cell bodies in the SCN of chronic 6% casein-fed rats of 30 and 90 days of life [20]. A decrease in the number and density of astrocytes and neurons containing vasoactive intestinal polypeptide and vasopressin in the SCN was also reported in chronic malnourished rats at 150 days [2]. Although in these previous studies [2,20] the low-protein diet was administered starting at 5 weeks prior to mating, the low body weight observed at P30 [2] is comparable to values obtained in the present study, suggesting that the RBD since gestation is equally effective in producing severe malnutrition in rats. Preliminary results obtained in our laboratory also indicate that RBD administered since gestation or lactation reduces the number of astrocytes in the SCN at P30 and P60 (unpublished results).

Changes in the retinal input to the SCN

A reduction in the SCN area containing CTb-labeled RHT axon terminals in the GLA group at P30 was the main effect observed in the RHT. Considering that the relative optical density of these axon terminals did not differ significantly between malnourished and control rats, it is possible to infer that the smaller area occupied by RHT in the GLA group was proportional to the decrease in the size of the SCN detected by Nissl staining.

The development of RHT has been described in Wistar rats in previous studies [15,47,53,70,72]. According to Takatsuji *et al.* [72], who used CTb tracing, the retinohypothalamic projection is already present at birth, gradually increases between P10 and P20 and reaches the adult pattern between P20 and P30, when the tracer labeling decreases in the dorsomedial part of the SCN. The data obtained in the present study in 33 day-old GLA animals suggest that in spite of the reduced area occupied by RHT, this tract reaches in the SCN a pattern similar to that observed in control rats. Such results, however,

do not rule out the possibility of a developmental delay of this tract before P30. Indeed, preliminary data obtained in our laboratory indicates that at P27 there is an increase in the density of retinal terminals in the SCN of GLA animals as compared to controls (unpublished results). A delay of approximately 3 days in eye opening was observed in RBD-malnourished rats [3,22]. It remains to be verified whether such delay could have some effect on the development of RHT prior to 30 days of age.

To our knowledge, this is the first report on the potential effects of malnutrition on the RHT. We have not analysed whether the distribution of this tract was modified in adjacent hypothalamic areas. Nevertheless, the data herein obtained and our preliminary observations in animals at P27 suggest that the growth of retinal ganglion cell axons projecting to the SCN is not affected by severe malnutrition during brain development.

Geniculohypothalamic tract

A similar distribution of geniculohypothalamic terminals containing NPY in the SCN has been previously reported in control and 6% casein-fed rats at P150 [2]. The results obtained in the present study indicate that in RBD malnourished rats since gestation, such distribution is similar already at P30, indicating that the development of the GHT is very resistant to severe nutritional insults.

The results obtained in the IGL point out that also the neurogenesis and differentiation of NPY-immunoreactive somata were not modified in GLA animals. During development, the geniculate nuclei of several mammalian species are formed rapidly (neurogenesis starts at E14 and E15 in rats [49] and at E13 in the IGL of hamsters [57]) and ahead of the medial thalamus [6]. During this period, thalamic nuclei exhibit a full range of soma sizes, including large and small neurons comparable to those of adults [6,36,49]. In newborn rats, NPY-immunoreactive fibres are scarce in the SCN, but the number of these fibres increases greatly between P10 and P15, reaching the adult pattern at P20 [72].

Concluding remarks

The low RHT- and GHT vulnerability to the malnutrition effects documented in the present study, suggests that the altered circadian rhythmicity in the entrainment to light-dark cycle, reported previously in malnourished rats [2,16,18,19,21,30,34,35,66] cannot be

ascribed to impaired development or altered structural features of these tracts in the SCN. The present finding suggests that intrinsic functional properties of the retina or SCN and/or efferent projections of the SCN could be involved in the above-mentioned circadian changes. It has been established that the NPY concentration and its mRNA expression increase in homogenates of the hypothalamus after food restriction or during protein and energy deprivation during gestation or after birth [12,14,75]. To our knowledge, no similar studies have been performed in the IGL, so that it cannot be inferred at the moment whether the similar pattern of NPY immunoreactivity here observed in malnourished and control rats can be attributed to a lack of effects of RBD-induced malnutrition.

Several studies have demonstrated that malnutrition early in life affects mainly the central nervous system regions which undergo a postnatal cell proliferation phase [28,77], such as the cerebral [11,45] and cerebellar cortices [67], the hippocampus [8,27] and the olfactory bulb [5]. Neurogenesis of retinal ganglion cells, SCN and IGL cells starts at the same time (about E13-E14) but extends over different periods during gestation. The differentiation of the NPY-containing GHT fibres reaches the adult pattern earlier than the RHT; the retina and SCN are still immature for some time after birth. Therefore, such developmental pattern could contribute to the differential vulnerability to malnutrition observed in these components of the circadian timing system. The subtle differences found between the two malnourished animal groups (GLA and LA) in the retinal and SCN dimensions support the importance of the lactation period for the differentiation of these regions.

In addition, it should be taken into account that the fetal consequences of inadequate maternal intake of energy and protein during pregnancy are strongly influenced by the nutritional status of the mother prior to conception [26,55]. Recent evidence in RBD malnourished rats during gestation and lactation indicates, in membranes of the hypothalamus, that adequate levels of essential fatty acids, especially docosahexaenoic acid and arachidonic acid, are maintained [23]. These essential fatty acids are relatively important, during fetal growth and development, in processes such as neurogenesis, synaptogenesis and myelination [40]. Thus, despite the multideficient composition of RBD, compensatory mechanisms involved in the materno-fetal mobilisation of nutrients could

contribute to the apparent resistance of neuronal cell populations investigated in the present study, and especially those of the retina and IGL.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Z. C. Xavier, M. A. Silva for technical assistance; to Dr. Luiz Roberto G. Britto for helpful comments on the manuscript. The collaborations of Dr. Alexandre Motta Bittencourt and Diógenes Luiz da Mota (Departamento de Anatomia-UFPE) for the use of Image-Lab software and of the LEAAL-Departamento de Nutrição-UFPE in performing the analysis of diet composition are gratefully appreciated. The acquisition of some reagents used in this work was supported by MCT-PRONEX to R.C.A.G.; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-COFECUB, N^o 296-99/I) and PROPESQ/UFPE to B.L.S.A.C. and M.L.M.A and CAPES-COFECUB N^o 417/03 to B.L.S.A.C. R.C.A.G and M.L.M.A. This work was partially presented at the XVII Annual Meeting of the FESBE, Salvador, BA, August 29-31, 2002, and is part of a Master's thesis presented by M.C.R.V. to the Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFPE, Recife, Brazil. R.C.A.G. is Research Fellow of CNPq (No.52.0722/96-5)

REFERENCES

1. Agarwal, K.N.; Prasad, C.; Taneja, V. Protein deprivation and the brain: Effect on enzymes and free amino acids related to glutamate metabolism in rats. *Ann. Nutr. Metabol.* 25: 228-233; 1981.
2. Aguilar-Roblero, R.; Salazar-Juarez, A.; Rojas-Castañeda, J.; Escobar, C.; Cintra, L. Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats. *AJP- Integ. Comp. Physiol.* 273: 1321-1331; 1997.
3. Almeida, M.F.L.; Yamasaki, E.N.; Silveira, A.C.D.; Guedes, R.C.A. Hokoç, J.N. The GABAergic and cholinergic systems in the retina are differentially affected by postnatal malnutrition during the suckling period. *Nutr. Neurosci.* 4: 223-238; 2001.

4. Almeida, S.S.; Duntas, L.H.; Dye, L.; Nunes, M.L.; Prasad, C.; Rocha, J.B.T.; Wainwright, P.; Zaia, C.T.B.V. Guedes, R.C.A. Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. *Nutr. Neurosci.* 5: 311-320; 2002.
5. Almli, C.P.; Henault, M.A; Velozco, A. Morgane, P.J. Ontogeny of electrical of main olfactory bulb in freely-moving normal and malnourished rats. *Brain Res.* 350: 1-11; 1985.
6. Altman, J.; Bayer, S.A. Development of the diencephalons in the rat. IV. Quantitative study of the time of origin of neurons and the internuclear chronological gradients in the thalamus. *J. Comp. Neurol.* 188: 455-471; 1979.
7. Andrade, A.F.D.; Guedes, R.C.A.; Teodósio, N.R. Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23: 889-893; 1990.
8. Andrade, J.P.; Madeira, M.D.; Paula-Barbosa, M.M. Effects of long-term malnutrition and rehabilitation on the hippocampal formation of the adult rat. A morphometric study. *J. Anatomy* 187: 379-393; 1995.
9. Ballabriga, A. Some aspects of clinical and biochemical changes related to nutrition during brain development in humans. *Dev. Neurobiol.* 12: 271-285; 1989.
10. Barreto Medeiros, J.M.; Cabral Filho, J.E.; Souza, S.L. de; Freitas Silva, S.R.; Mendes da Silva, C.; Deiró, T.C.B.J.; Monteiro, J.M.; Guedes, R.C.A.; Castro, C.M.M.B.; Manhães de Castro, R. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. *Nutr. Neurosci.* 5: 211-214; 2002.
11. Bass, N.H.; Netsky, M.G.; Young, E. Effects of neonatal malnutrition on developing cerebrum. I: Microchemical and histological study of cellular differentiation in the rat. *Arch. Neurol.* 23: 289-302; 1970.
12. Beck B.; Jhanwar-Uniyal, M.; Burlet, A.; Chapleur-Chateau, M.; Leibowitz, S. F.; Burlet, C. Rapid and localized alterations of neuropeptide Y in discrete hypothalamic nuclei with feeding status. *Brain Res.* 528: 245-249; 1990.

13. Borba, J.M.C; Araújo, M.S.; Picanço-Diniz, C.W.; Manhães De Castro, R.; Guedes, R. C.A. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. *Brain Res. Bull.* 53: 193-201; 2000.
14. Brady, L.S.; Smith, M.A.; Gold, P.W.; Herkenham, M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide Y mRNAs in food restricted and food deprived rats. *Neuroendocrinol.* 52: 441-447; 1990.
15. Bunt, S.M.; Lund, R.D.; Land, P.W. Prenatal development of the optic projection in albino and hooded rats. *Dev. Brain Res.* 6: 149-168; 1983.
16. Castañón-Cervantes, O.; Cintra, L. Circadian rhythms of occipital-cortex temperature and motor activity in young and old rats under chronic protein malnutrition. *Nutr. Neurosci.* 5: 279-286; 2002.
17. Chen, J.-C.; Tonkiss, J.; Galler, J.R.; Volicer, L. Prenatal protein malnutrition in rats enhances serotonin release from hippocampus. *J. Nutr.* 122: 2138-2143; 1992.
18. Cintra, L.; Diaz-Cintra, S.; Galván, A.; Morgane, P.J. Circadian rhythm of sleep in normal and undernourished rats. *Bol. Estud. Méd. Biol. Méx.* 36: 3-17; 1988.
19. Cintra, L.; Durán, P.; Guevara, M.A.; Aguilar, A. Castañón-Cervantes, O. Pre- and post-natal protein malnutrition alters the effect of rapid eye movements sleep-deprivation by the platform-technique upon the electrocorticogram of the circadian sleep-wake cycle and its frequency bands in the rat. *Nutr. Neurosci.* 5: 91-101; 2002.
20. Cintra, L.; Galván, A.; Diaz-Cintra, S.; Escobar, C. Protein malnutrition on suprachiasmatic nucleus cells in rats of three ages. *Bol. Estud. Méd. Biol. Méx.* 42: 11-19; 1994.
21. Cipolla Neto, J.; Recine, E.G.I.G.; Menna-Barreto, L.; Marques, N.; Afeche, S.C.; Schott, C.; Fortunato, G.; Sothorn, R.B.; Halberg, F. Perinatal malnutrition, suprachiasmatic nuclear lesioning, and circadian-ultradian aspects of spontaneous

- behavior of albino rats. *Advances in Chronobiology Part B*. New York: Wiley-Liss, 1987, 473-489.
22. Costa, F.B.; Costa, J.A.; Cabral Filho, J.E.; Guedes, R.C.A.; Teodósio, N.R. Indicadores de maduración nerviosa y somática en un modelo experimental de desnutrición. In: Seminario Internacional “Desnutrición y Funciones Cerebrales Superiores”, Resúmenes de Conferencias e Comunicaciones Libres. Santiago, Universidad de las Naciones Unidas, 1983. p. 89.
23. Costa, S.P.M.. Influência de uma desnutrição multifatorial na composição dos ácidos graxos de fosfolípidos do sistema nervoso central e fígado em diferentes períodos do desenvolvimento do rato. Recife, 2003. Master Thesis – Universidade Federal de Pernambuco, 2003.
24. Coutinho, E.M.; Freitas, L.P.C.G.; Abath, F.G.G. The influence of the regional basic diet from northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 25: 13-20; 1992.
25. Datta, S.; Patterson, E.H.; Vincitore, M.; Tonkiss, J.; Morgane, P.J.; Galler, J.R. Prenatal protein malnourished rats show changes in sleep-wake behavior as adults. *J. Sleep Res.* 9: 71-79; 2000.
26. Desai, M.; Hales, C.N. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol. Rev.* 72: 329-348; 1997.
27. Diaz-Cintra, S.; Cintra, L.; Galván, A.; Aguilar, A.; Kemper, T.; Morgane, P.J. Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J. Comp. Neurol.* 310: 356-364; 1991.
28. Escobar, C.; Salas, M. Neonatal undernutrition and amygdaloid nuclear complex development: an experimental study in the rat. *Exp. Neurol.* 122: 311-318; 1993.
29. Esseveldt, L.E. Van; Lehman, M.N.; Boer, G.J. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res. Rev.* 33: 34-77; 2000.

30. Forbes, W.B.; Tracy, C.A.; Resnick, O.; Morgane, P.J. Effect of protein malnutrition during development on sleep behavior of rats. *Exp. Neurol.* 57: 440-450; 1977.
31. Fukuda, Y.A. Three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies. *Brain Res.* 119: 327-344; 1977.
32. Guedes, R.C.A.; Andrade, A.F.D.; Cabral Filho, J.E. Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein deficiency. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20: 639-642; 1987.
33. Guedes, R.C.A.; Santos-Monteiro, J.; Teodósio, N.R. Malnutrition and brain function; experimental studies using the phenomenon of cortical spreading depression. *Rev. Brasil. Biol.* 56: 293-301; 1996.
34. Hall, R.D.; Forbes, W.B.; Robertson, W.M. The effects of protein malnutrition on the rat's circadian pattern of food and water intake. *Nutr. Rep. Int.* 18: 713-720; 1978.
35. Hebert, D.C.; Reiter, R.J. Influence of protein-caloric malnutrition on the circadian rhythm of pineal melatonin in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 166: 360-366; 1981.
36. Hickey T.L.; Hitchcock, P.F. Genesis of neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 228: 186-199; 1984.
37. Horsburgh, G.M.; Sefton, A.J. Cellular degeneration and synaptogenesis in the developing retina of the rat. *J. Comp. Neurol.* 263: 553-566; 1987.
38. Hughes, A. The topography of vision in mammals of contrasting life style: comparative optics and retinal organization. In: *Handbook of Sensory Physiology. Vol. VII/5 The Visual System in Vertebrates* (Edited by Crescitelli F.), Springer-Verlag, Berlin; 1977: 613-756.
39. Ibata, Y.; Okamura, H.; Tanaka, M.; Tamada, Y.; Hayashi, S.; Iijima, N.; Matsuda, T.; Munekawa, K.; Takamatsu, T.; Hisa, Y.; Shige-yoshi, Y.; Amaya, F. Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Frontiers in Neuroendocrinol.* 20: 241-268; 1999.

40. Innis, S.M. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev. Neurosci.* 22: 474-480; 2000.
41. Kennaway, D.J. Programming of the fetal suprachiasmatic nucleus and subsequent adult rhythmicity. *Trends in Endocrinol. Metab.* 13: 398-402; 2002.
42. Lago, E.S.; Teodósio, N.R.; Pontes Pessoa, D.C.; Cabral Filho, J.E. Duración de la vida en ratas desnutridas, utilizando dieta básica del nordeste brasileño. *Arch. Latinoam. Nutr.* 47: 338-342; 1997.
43. Leal, A.M.O.; Moreira, A.C. Food and the circadian activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30: 1391-1405; 1997.
44. Levitsky, D.A.; Strupp, B.J. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J. Nutr.* 125: 2212-2220; 1995.
45. Lewis, P.D.; Balázs, R.; Patel, A.J.; Johnson, A.L. The effects of undernutrition in early life on cell generation in the rat brain. *Brain Res.* 893: 235-247; 1975.
46. Marin, M.C.; Tomás, M.E.; Serres, C.; Mercuri, O. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 125: 1017-1024; 1995.
47. Mason, C.A.; Lincoln, D.W. Visualization of the retino-hypothalamic projection in the rat by cobalt precipitation. *Cell Tissue Res.* 168: 117-131; 1976.
48. Mc Call, M.J.; Robinson, S.R.; Dreher, B. Differential retinal growth appears to be the primary factor producing the ganglion cell density gradient in the rat. *Neurosci. Lett.* 79: 78-84; 1987.
49. McAllister, J.P.II; Das, G.D. Neurogenesis in the epithalamus, dorsal thalamus and ventral thalamus of the rat: An autoradiographic and cytological Study. *J. Comp. Neurol.* 172: 647-686; 1977.

50. Michell, S.; Colwell, C.S. Cellular communication and coupling within the suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol. Internat.* 18: 579-600; 2001.
51. Mistlberger, R.E. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 171-195; 1994.
52. Monteiro, F.M.F.; Albuquerque, J.A.; Cabral, A.M.S. Influence of a multideficient diet from northeastern Brazil on resting blood pressure and baroreflex sensitivity in conscious, freely moving rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34: 271-280; 2001.
53. Moore, R.Y. Development of the suprachiasmatic nucleus, In: D. C. Klein, R. Y. Moore and S. M. Reppert (eds.), *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*. Oxford University Press, New York, 1991: 391-404.
54. Morest, D.K. The pattern of neurogenesis in the retina of the rat. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* 131: 45-67; 1970.
55. Morgane, P.J.; Austin-Lafrance, R.; Bronzino, J.; Tonkiss, J.; Diaz-Cintra, S.; Cintra, L.; Kemper, T.; Galler, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17: 91-128; 1993.
56. Morgane, P.J.; Miller, M.; Kemper, T.; Stern, W.; Forbes, W.; Hall, R.; Bronzinno, J.; Kissane, J.; Hawrylewicz, E.; Resnick, O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2: 137-230; 1978.
57. Morin, L.P. The circadian visual system. *Brain Res. Rev.* 67: 102-127; 1994.
58. Onis, M. de; Montiero, C.; Akre, J.; Clugston, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO global database on child growth. *Bulletin of World Health Organization* 71: 703-712; 1993.
59. Paixão, A.D.O.; Nunes, F.A.; Monteiro, J.C.; Maciel, C.R. Low sodium chloride content in a multideficient diet induces renal vasodilatation in rats. *Nutr. Res.* 23: 85-89; 2003.

60. Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2th edition. California: Academic Press Inc., 1986.
61. Picanço-Diniz, C.W.; Araújo, M.S.; Borba, J.M.C.; Guedes, R.C.A. NADPH-diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutr. Neurosci.* 1: 35-48; 1998.
62. Pontes Pessoa, D.C.N. de; Lago, E.S.; Teodósio, N.R.; Bion, F.M. Dietary proteins on reproductive performance in three consecutive generations of rats. *Arch. Latinoam. Nutr.* 50: 55-61; 2000.
63. Rabin, O.; Lefauconnier, J.-M; Chanez, C.; Bernard, G.; Bourre, J.-M. Developmental effects of intrauterine growth retardation on cerebral amino acid transport. *Pediatr. Res.* 35: 640-648; 1994.
64. Reese B.E.; Colello R.J. Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neuroscience* 46: 419-29; 1992.
65. Resnick, O.; Miller, M.; Forbes, W.; Hall, R.; Kemper, T.; Bronzino, J.; Morgane, J.P. Developmental protein malnutrition: Influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 3: 233-246; 1979.
66. Salas, M.; Ruiz, C.; Torrero, C.; Pulido, S. Neonatal food restriction: its effects on the sleep cycles and vigil behavior of adult rats. *Bol. Estud. Méd. Biol. Méx.* 32: 209-215; 1983.
67. Sharma, S.K.; Nayar, U.; Maheshqari, M.C.; Singh, B. Effects of undernutrition on developing rat cerebellum: some electrophysiological and neuromorphological correlates. *J. Neurol. Sci.* 78: 261-272; 1987.
68. Sherwood, N.M.; Timiras, P.S.A. *Stereotaxic Atlas of the Developing Rat Brain*. Los Angeles, California: University of California Press, Ltd., 1970.
69. Sidman, R.L. Histogenesis of the mouse retina studied with thymidine- H^3 . In: G. K. Smelser, ed. *The structure of the eye*, 1961: 487-506.

70. Speh, J.C.; Moore, R.Y. Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. *Dev. Brain Res.* 76: 171-181; 1993.
71. Stone, J. A guide to the preparation and analysis of retinal whole mounts. Maitland Publications Pty. Ltd.; 1981.
72. Takatsuji, K.; Oyamada, H.; Tohyama, M. Postnatal development of the substance-P, neuropeptide-Y and serotonin-containing fibers in the rat suprachiasmatic nucleus in relation to development of the retinohypothalamic projection. *Dev. Brain Res.* 84: 261-270; 1995.
73. Teodósio, N.R.; Lago, E.S.; Romani, S.A.M.; Guedes, R.C.A. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch. Latinoam. Nutr.* 4: 533-547; 1990.
74. Uauy, R.; Hoffman, D.R.; Peirano, P.; Birch, D.G.; Birch, E.E. Essential fatty acids in visual brain development. *Lipids* 36: 885-895; 2001.
75. Warnes, K.E.; Morris, M.J.; Symonds, M.E.; Phillips, I.D.; Clarke, I.J.; Owens, J.A.; Mcmillen, I.C. Effects of increasing gestation, cortisol and maternal undernutrition on hypothalamic neuropeptide Y expression in the sheep fetus. *J. Neuroendocrinol.* 10: 51-57; 1998.
76. Weaver, D.R. The suprachiasmatic nucleus: A 25-year retrospective. *J. Biol. Rhythms* 13: 100-112; 1998.
77. West, C.D.; Kemper, T.L. The effects of a low protein diet on the anatomical development of the rat brain. *Brain Res.* 107: 221-237; 1976.

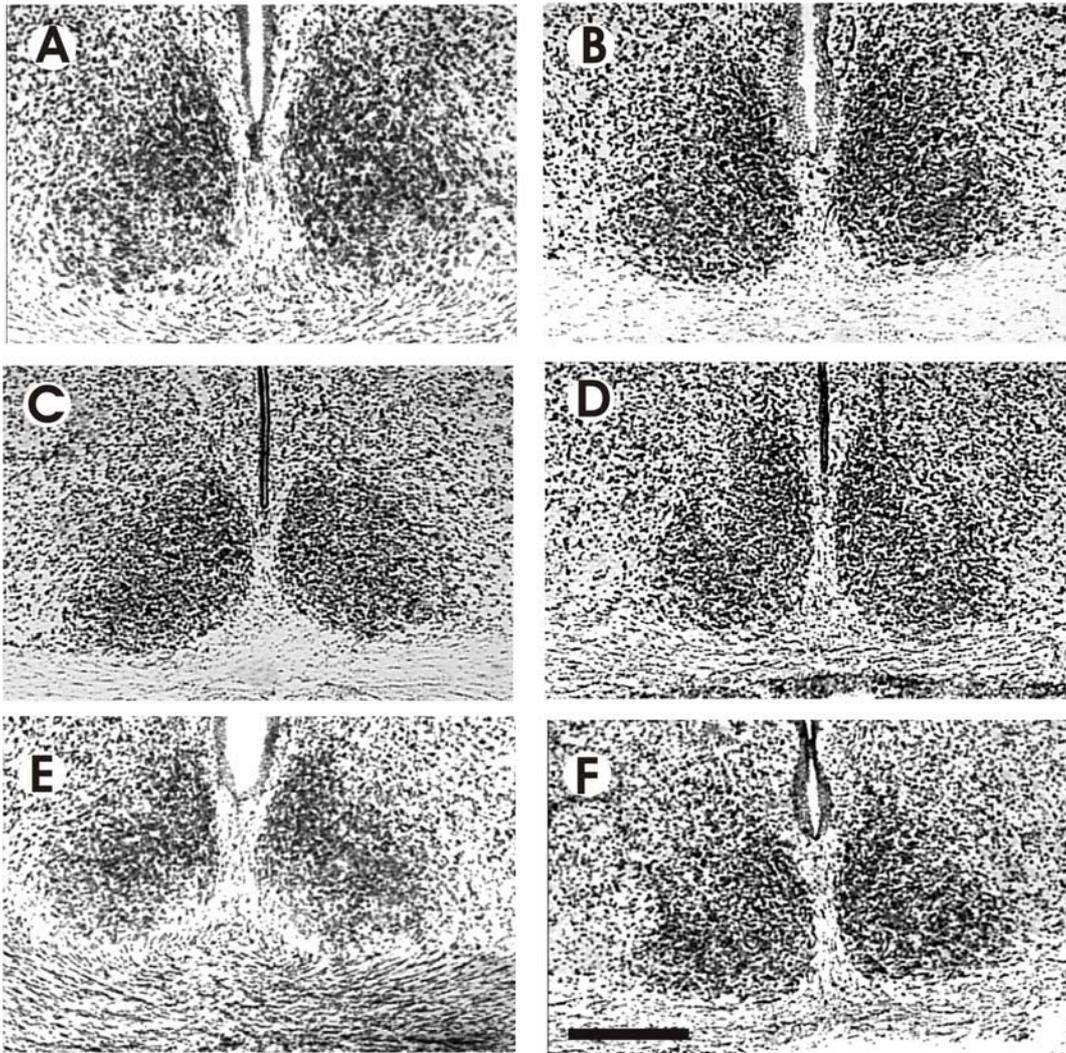


FIGURE 1: Digital images of Nissl-stained sections through the suprachiasmatic nucleus (SCN) at the middle level. Note the reduction in the size of the SCN in rats malnourished from gestation (C and D) or lactation (E and F) as compared to controls (A and B), either at 30 (A, C and E) or 60 days (B, D and F) of age. Scale bar = 250 μm .

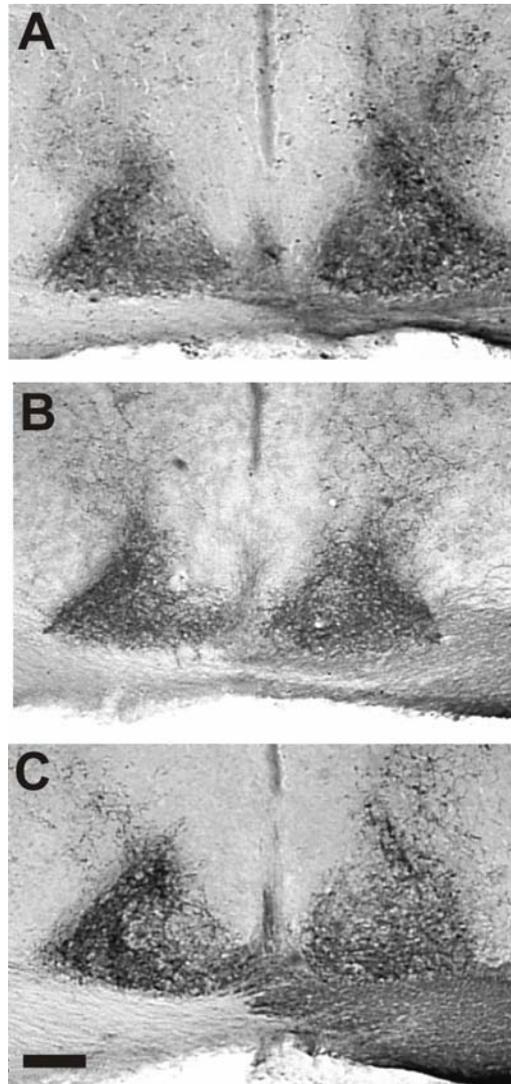


FIGURE 2: Digital images of coronal sections of rat brain through the suprachiasmatic nucleus (SCN) at the middle level. CTb-immunostained fibres or terminals are concentrated in the ventral portion of the SCN. Note the similarity in the immunoreactivity pattern at P33 among representative sections of control rats (A), rats malnourished from gestation (GLA group; B) and rats malnourished from lactation (LA group; C). However, despite the similar pattern, the area of SCN containing CTb immunoreactive fibres in GLA rats (B) is reduced, compared to control and LA animals. Scale bar = 125 μ m.

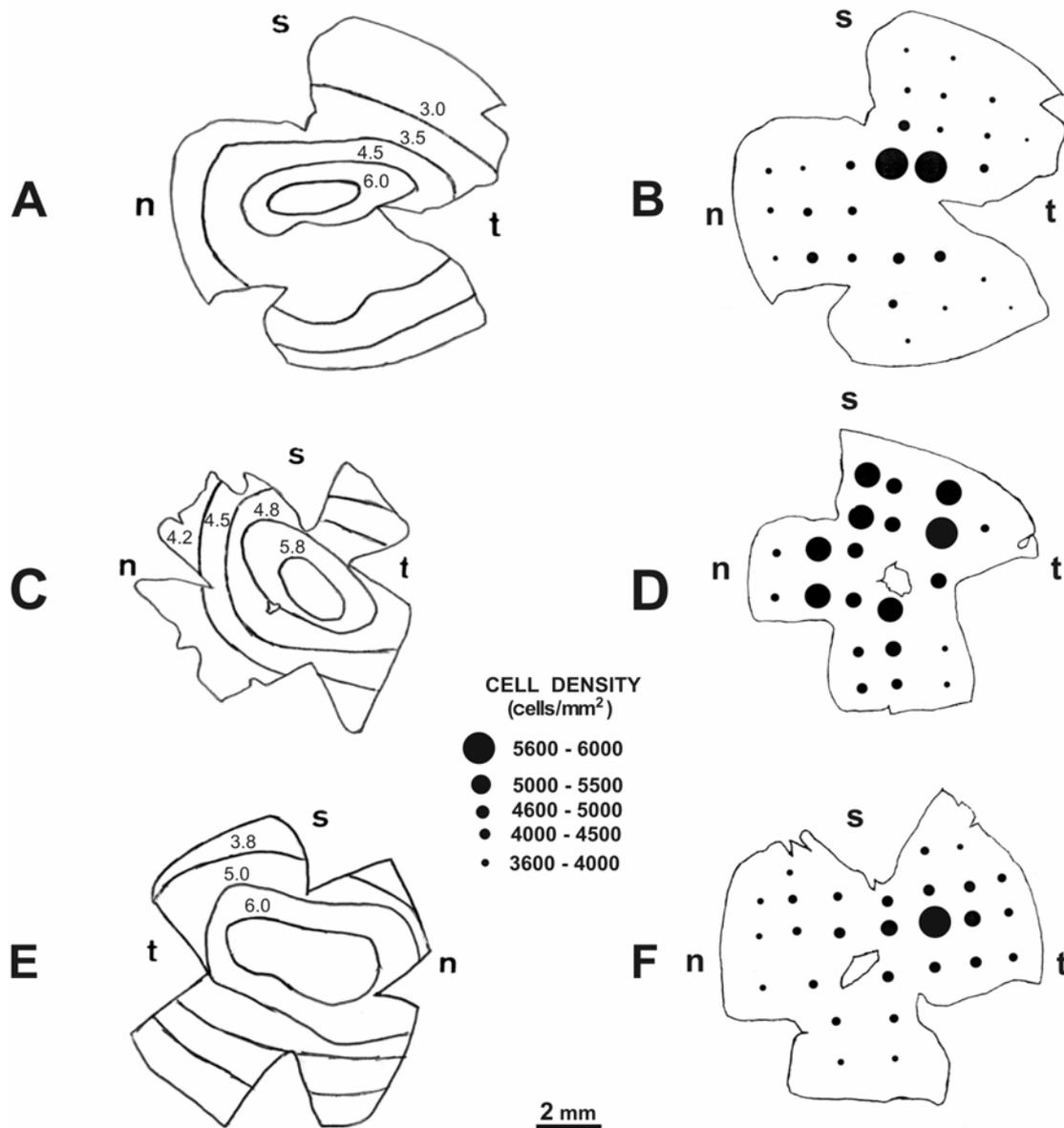


FIGURE 3: Topographical distribution of ganglion cell density in retinal whole mounts of control rats (A and B), rats malnourished from gestation (C and D) and rats malnourished from lactation (E and F) at 30 days of age. Isodensity lines are shown in A, C and E. Values represent cells/mm² x 10³. Density values in each sampling window are represented by spheres of different sizes in B, D and F; s, t and n indicate the superior; temporal and nasal margins of the retina, respectively. Note the higher cell density in midperipheral and far peripheral regions of the retina in malnourished animals (C-F) as compared to that observed in their respective controls (A,B).

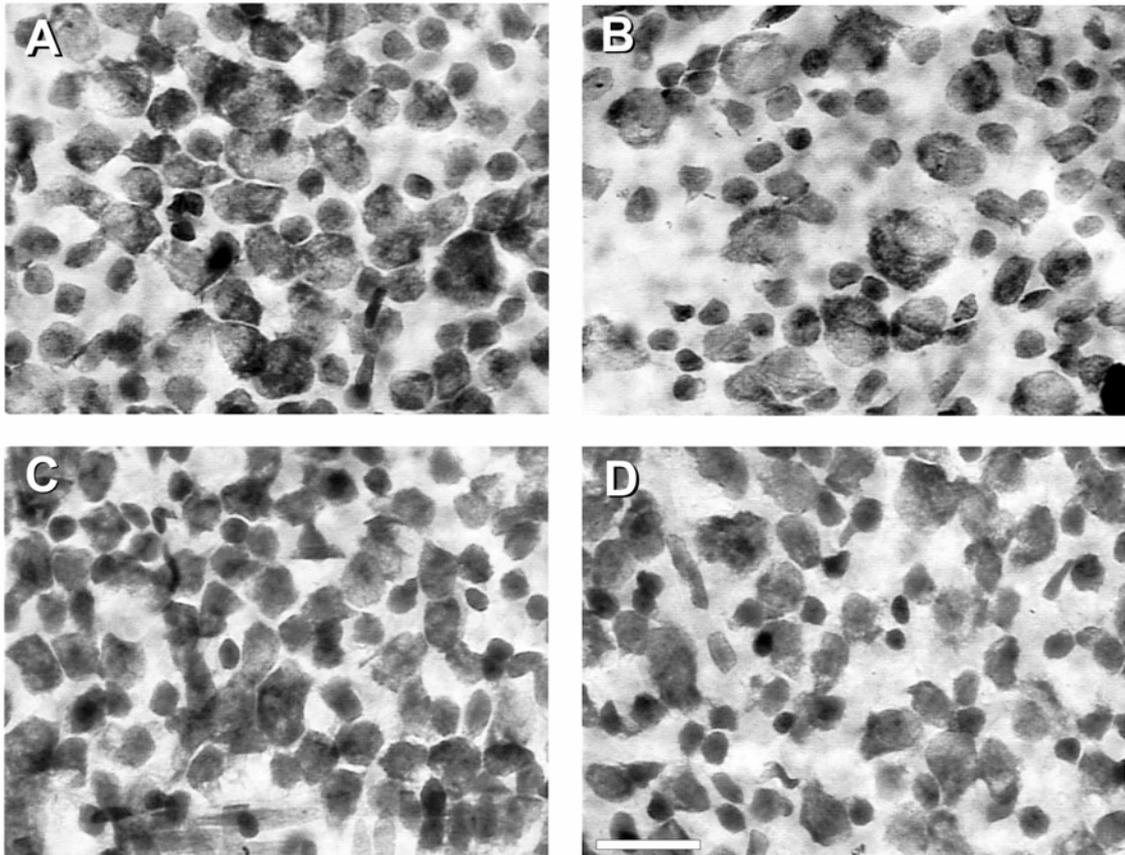


FIGURE 4: Digital images of the retinal ganglion cell layer in representative Nissl-stained whole mounts of a control rat (A and B) and a rat malnourished since gestation (C and D) at central (A and C) and peripheral retinal regions (B and D). Note in D the higher density and the smaller size of the neuronal cell bodies in the malnourished rat, in the peripheral region of the retina. Scale bar: 25 μm .

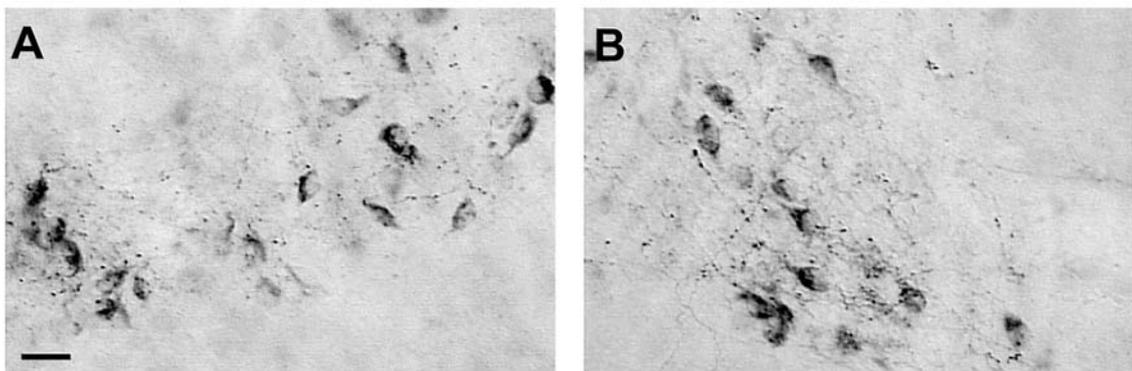


FIGURE 5: NPY immunoreactivity in neuronal cell bodies and processes at the rostral level of the intergeniculate leaflet (IGL) of a representative control rat (A) and of a rat malnourished since gestation (B) at 30 days of age. Note the similar distribution of cells and NPY immunoreactivity pattern in the two animals. Scale bar: 20 μ m.

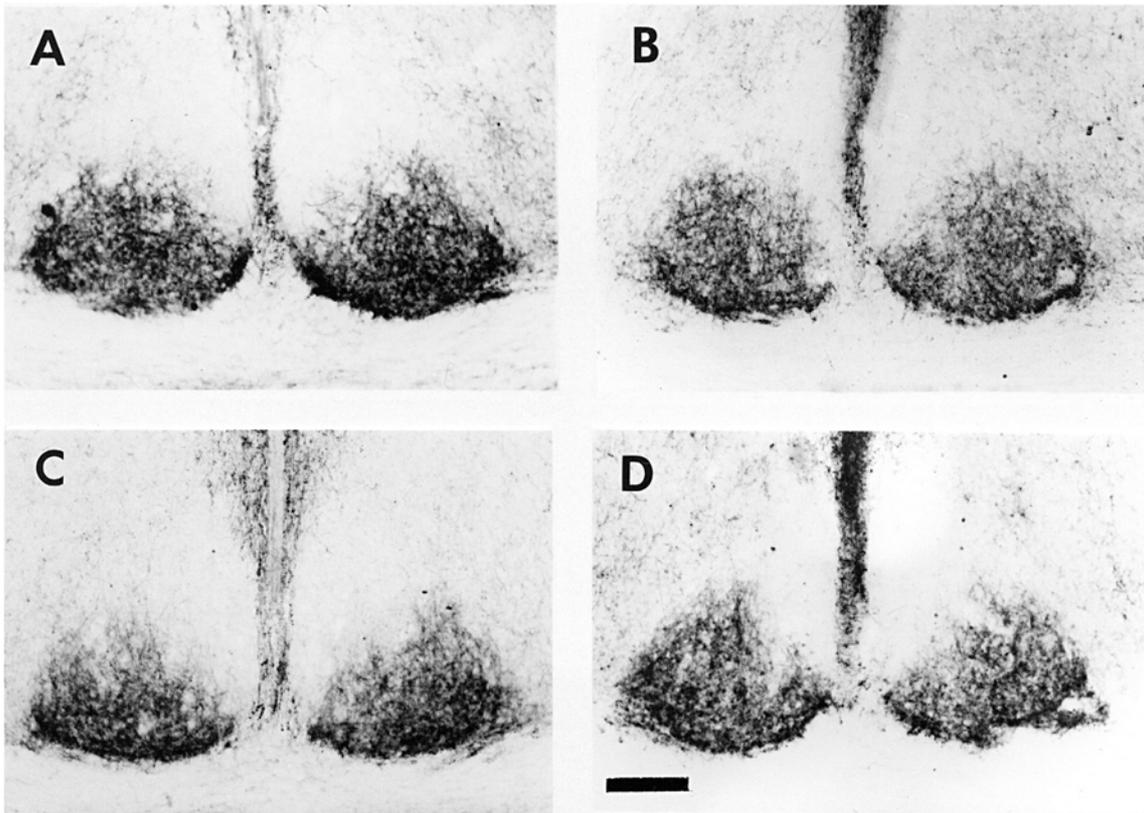


FIGURE 6: Digital images of NPY immunoreactivity through the middle level of the suprachiasmatic nucleus (SCN). NPY-immunoreactive fibres or terminals are concentrated in the ventral portion of the SCN. Note the similarity in the immunoreactivity pattern between control rats (A and B) and rats malnourished from gestation (C and D) at postnatal days 33 (A and C) and 63 (B and D). Scale bar = 125 μ m.

TABLE 1**COMPOSITION OF THE “REGIONAL BASIC DIET”**

Ingredients	g/100g	Protein	Carbohydrate	Fat	Ash	Fibres	Kcal% [♦]
Beans*	18.34	3.99	10.66	0.24	0.57	1.09	60.76
Manioc flour	64.81	0.84	48.59	0.12	0.43	5.64	198.80
Defatted, dried, salted Meat*	3.74	2.74	-	0.06	0.06	-	11.50
Fat (from the meat)	0.35	-	-	0.35	-	-	3.15
Sweet potato*	12.76	0.30	9.99	0.03	0.20	0.48	41.43
Total	100.00	7.87	69.24	0.80	1.26	7.21	315.64

[♦]Expressed as Kcal provided by 100 g of diet.

* Cooked, dried and ground

TABLE 2
BODY AND BRAIN WEIGHTS

Experimental Groups	Body Weights (g ± SD)	Brain Weights (g ± SD)	Brain / Body Weights Ratio (%)
C 30 female	90.06 ± 9.25 (n=12)	1.63 ± 0.18 (n=12)	1.74 ± 0.18
male	97.37 ± 11.71 (n=12)	1.68 ± 0.17 (n=12)	1.67 ± 0.19
GLA 30 female	⊗# 27.45 ± 5.33 (n=15)	⊗# 1.20 ± 0.11 (n=15)	5.04 ± 1.17
male	⊗# 28.14 ± 5.06 (n=13)	⊗# 1.24 ± 0.10 (n=13)	4.55 ± 0.78
LA 30 female	# 41.44 ± 4.39 (n=13)	# 1.37 ± 0.08 (n=13)	3.77 ± 0.83
male	# 40.54 ± 5.19 (n=10)	# 1.38 ± 0.11 (n=10)	4.18 ± 0.64
C 60 female	* 192.33 ± 21.64 (n=14)	1.88 ± 0.22 (n=14)	0.99 ± 0.13
male	263.72 ± 45.95 (n=12)	1.87 ± 0.12 (n=12)	0.73 ± 0.09
GLA 60 female	⊗# 34.94 ± 7.88 (n=16)	⊗# 1.30 ± 0.14 (n=16)	3.52 ± 0.94
male	⊗# 42.72 ± 11.63 (n=11)	⊗# 1.29 ± 0.13 (n=11)	2.95 ± 0.74
LA 60 female	# 65.40 ± 12.67 (n=9)	# 1.44 ± 0.11 (n=9)	2.46 ± 0.45
male	# 73.91 ± 9.88 (n=8)	# 1.49 ± 0.13 (n=8)	2.15 ± 0.31

Data are expressed as mean ± standard deviation. GLA, rats malnourished from gestation; LA, rats malnourished from lactation; C, control rats; 30 and 60 represent the age of the animals.

⊗ significant difference between malnourished groups (same sex)

significantly different from the respective control

*significant difference between the sex within each group (*t*-test, *p* < 0.05)

TABLE 3
SCN AREA AND AREA OCCUPIED BY RHT
AXON TERMINALS

NISSSL STAINING		
GROUPS	Area ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$)	Mean Diameter ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)
C 30 <i>n=15 (7 f; 8 m)</i>	101,905.48 \pm 11,972.45	372.52 \pm 21.57
GLA 30 <i>n=16 (10 f; 6 m)</i>	$\otimes\#$ 82,889.30 \pm 11,280.07	$\otimes\#$ 335.91 \pm 24.39
LA30 <i>n=14 (6 f; 8 m)</i>	$\#$ 92,331.93 \pm 8,183.01	$\#$ 356.49 \pm 23.01
CTb –IMMUNOREACTIVE FIBRES		
GROUPS	Area ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$)	Mean Diameter ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)
C 30 <i>n=5 (3f; 2m)</i>	66,900.18 \pm 3,536.11	323.34 \pm 10.18
GLA 30 <i>n=5 (3f; 2m)</i>	$\otimes\#$ 57,841.53 \pm 1,850.59	$\otimes\#$ 304.09 \pm 7.81
LA 30 <i>n=5 (3f; 2m)</i>	67,099.34 \pm 6,687.12	324.87 \pm 19.18

Data are expressed as mean \pm standard deviation.

GLA, rats malnourished from gestation; LA, rats malnourished from lactation; C, control rats; 30 and 60 represent the age of the animals.

\otimes significant difference between malnourished groups

$\#$ significant difference from the respective control

(*t*-test, and Student Newman-Keuls test, $p < 0.05$)

TABLE 4**MORPHOMETRIC PARAMETERS OF
NPY-IMMUNOREACTIVE CELLS**

IGL		
Soma Size		
Groups	Area ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$)	Mean Diameter ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)
Control (<i>n</i> = 400)	99.64 \pm 28.14	11.35 \pm 1.87
GLA (<i>n</i> = 400)	93.70 \pm 24.97	10.92 \pm 1.73
SCN		
Area of NPY-immunoreactive fibres ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$)		
Groups	Area ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$)	Mean Diameter ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)
C 30 <i>n</i> =7 <i>f</i> ; 6 <i>m</i>	47328.68 \pm 5517.35	256.43 \pm 15.38
C 60 <i>n</i> =7 <i>f</i> ; 7 <i>m</i>	49983.45 \pm 5592.39	264.18 \pm 14.08
GLA 30 <i>n</i> =6 <i>f</i> ; 7 <i>m</i>	44999.70 \pm 7090.88	250.01 \pm 20.24
GLA60 <i>n</i> =7 <i>f</i> ; 6 <i>m</i>	47595.06 \pm 6092.98	255.37 \pm 16.52

Data are expressed as mean \pm standard deviation.
 GLA, rats malnourished from gestation; C, control rats;
 30 and 60 represent the age of the animals. *f*, females; *m*, males
 IGL, intergeniculate leaflet; SCN, suprachiasmatic nucleus.

III. CONCLUSÕES

- 1) Os resultados indicam uma resistência diferenciada da retina, núcleo supraquiasmático do hipotálamo e folheto intergeniculado do tálamo diante da má-nutrição severa induzida pela DBR durante as fases de gestação e aleitamento.
- 2) O crescimento do tecido retiniano e os limites citoarquitetônicos do NSQ foram alterados de forma significativa pela DBR em animais de até 60 dias de vida.
- 3) Alteração na distribuição topográfica das células ganglionares foi detectada nas regiões periféricas da retina cujo crescimento ocorre principalmente durante o período de aleitamento.
- 4) A DBR apesar de ser uma dieta multideficiente, com baixo teor de proteínas tanto em quantidade quanto em qualidade, mesmo quando administrada a partir do período de gestação, não comprometeu de forma significativa os processos de neurogênese, diferenciação e crescimento axonal de neurônios da retina e folheto intergeniculado do tálamo envolvidos com o desenvolvimento das projeções retino e genículo-hipotalâmicas para o NSQ.
- 5) Os resultados sugerem que mesmo diante de um insulto nutricional crônico e severo, as relações estruturais estabelecidas por estas projeções no NSQ não justificam por si só as alterações na sincronização ao ciclo claro-escuro ambiental e os desvios de fase observados em ritmos comportamentais de animais desnutridos.

IV. PERSPECTIVAS

Os resultados desta pesquisa referente aos possíveis efeitos de uma desnutrição severa em alguns dos componentes do sistema de temporização circadiana, mostram a necessidade de prosseguir a investigação destes dados para melhor compreensão dos mecanismos de sincronização do relógio biológico. A seguir serão apresentadas algumas possibilidades de pesquisa que em muito contribuiriam para o entendimento desta função biológica em animais desnutridos

- Estender a análise da retina para idades maiores que 60 dias de vida, visando saber se em algum momento do desenvolvimento dos ratos mal nutridos severa e cronicamente, ocorrerá uma normalização no crescimento da retina e na densidade das células ganglionares em regiões periféricas.
- Estudar do ponto de vista molecular se as células do FIG aumentam a expressão do RNAm bem como a concentração de NPY em animais desnutridos
- Verificar a possibilidade de alterações das propriedades funcionais intrínsecas da retina e dos neurônios do NSQ e / ou das projeções eferentes envolvidas na ritmicidade circadiana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSON, E. E. and MOORE, R. Y. *Suprachiasmatic Nucleus in the Mouse: Retinal Innervation, Intrinsic Organization and Efferent Projections*. Brain Research 916:172-191, 2001.

ABRAHAMSON, E. E. and MOORE, R. Y. *The Posterior Hypothalamic Area; Chemoarchitecture and Afferent Connections*. Brain Research 889:1-22, 2001.

AGUILAR-ROBLERO, R.; ARÉCHIGA, H.; ASHKENAZI, I.; BURIOKA, N.; CIPOLLA NETO, J.; CORNÉLISSEN, G.; MARKUS, R.; MARQUES, N.; MENEZES, A. A. L.; MONK, T. H.; RALPH, M.; VALDEZ-RAMIREZ, P. and MENNA-BARRETO, Luiz. *The Brain Decade in Debate: IV. Chronobiology*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 34:831-841, 2001.

AGUILAR-ROBLERO, R.; SALAZAR-JUAREZ, A.; ROJAS-CASTAÑEDA, J.; ESCOBAR, C. and CINTRA, L. *Organization of Circadian Rhythmicity and Suprachiasmatic Nuclei in Malnourished Rats*. AJP- Integrative and Comparative Physiology 273(4):1321-1331, 1997.

ALMEIDA, M. F. L.; YAMASAKI, E. N.; SILVEIRA, A. C. D.; GUEDES, R. C. A. and HOKOÇ, J. N. *The GABAergic and Cholinergic Systems in the Retina are Differentially Affected by Postnatal Malnutrition during the Suckling Period*. Nutritional Neuroscience 4:223-238, 2001.

ALMEIDA, S. S.; DUNTAS, L. H.; DYE, L.; NUNES, M. L.; PRASAD, C.; ROCHA, J. B. T.; WAINWRIGHT, P.; ZAIA, C. T. B. V. and GUEDES, R. C. A. *Nutrition and Brain Function: A Multidisciplinary Virtual Symposium*. Nutritional Neuroscience 5(5):311-320, 2002.

ALMLI, C. P.; HENAULT, M. A.; VELOZCO, A. and MORGANE, P. J. *Ontogeny of Electrical of Main Olfactory Bulb in Freely-moving Normal and Malnourished Rats*. Brain Res. 350: 1-11, 1985.

ANDRADE, A. F. D.; GUEDES, R. C. A. and TEODÓSIO, N. R.. *Enhanced Rate of Cortical Spreading Depression due to Malnutritional: Prevention by Dietary Protein Supplementation*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 23:889-893, 1990.

ANDRADE, J. P.; MADEIRA, M. D. and PAULA-BARBOSA, M. M. *Effects of long-term malnutrition and rehabilitation on the hippocampal formation of the adult rat. A morphometric study*. J. Anatomy 187: 379-393, 1995.

AUJARD, F.; HERZOG, E. D. and BLOCK, G. D. *Circadian Rhythms in Firing Rate of Individual Suprachiasmatic Nucleus Neurons from Adult and Middle-Aged Mice*. Neuroscience. 106:255-261, 2001.

- BALLABRIGA, A. *Some Aspects of Clinical and Biochemical Changes Related to Nutrition During Brain Development in Humans*. *Developmental Neurobiology* 12:271-285, 1989.
- BAN, Y.; SHIGEYOSHI, Y and OKAMURA, H. *Development of Vasoactive Intestinal Peptide mRNA Rhythm in the Rat Suprachiasmatic Nucleus*. *Journal of Neuroscience*. 17 (10): 3920-3931, 1997.
- BARRETO MEDEIROS, J. M.; CABRAL FILHO, J. E.; SOUZA, S. L. de; FREITAS SILVA, S. R.; MENDES DA SILVA, C.; DEIRÓ, T. C. B. J.; MONTEIRO, J. M.; GUEDES, R. C. A.; CASTRO, C. M. M. B. de and CASTRO MANHÃES, R. de. *Early Malnourished Rats are not Affected by Anorexia Induced by a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor in Adult Life*. *Nitrit. Neurosc.* 5 (3): 211-214, 2002.
- BASS, N. H.; NETSKY, M. G. and YOUNG, E. *Effects of Neonatal Malnutrition on Developing Cerebrum. I. Microchemical and Histologic Study of Cellular Differentiation in the Rat*. *Arch. Neurol.* 23: 289-302, 1970.
- BATISTA-FILHO, M.; LIMA, E. J.; COSTA, M. F. T. V. da; ANDRADE-LIMA, H.; VARELA, R. M.; BAZANTE, M. O. ; NASCIMENTO, J. S.; DANTAS, L. Y. de S.; MADRUGA, M. I. L.; VIEIRA, R.; REIS, F. M.; MARTINS, G. C.; VARELA, R. M.; GOMES, S. M. F. e LINHARES, E. R. *Pesquisa Nutricional na Zona da Mata. Recife, Universidade Federal de Pernambuco*. 1968.
- BIELLO, Stephany M.. *Enhanced Photic Phase Shifting after Treatment with Antiserum to Neuropeptide Y*. *Brain Research* 673:25-29, 1995.
- BIELLO, S. M.; GOLOMBEK, D. A.; SCHAK, K. M. and HARRINGTON, M. E. *Circadian Phase Shifts to Neuropeptide Y IN Vitro: Cellular Communication and Signal Transduction*. *Neuroscience* 17(21, issue 1):8468-8475, 1997.
- BUONOMANO, D.V.AND MERZENICH, M.M..*Cortical Plasticity: from Synapses to maps*.*Annu.Ver.Neurosci.* 21: 149-186, 1998.
- BORBA, J. M. C; ARAÚJO, M. S.; PICANÇO-DINIZ, C. W.; MANHÃES DE CASTRO, R. and GUEDES, R. C. A. *Permanent and Transitory Morphometric Changes of NADPH-Diaphorase-Containing Neurons in the Rat Visual Cortex after early Malnutrition*. *Brain Research Bulletin* 53(2):193-201, 2000.
- BREWER, J. Mc K.; YANNIELLI, P. C. and HARRINGTON, M. E. *Neuropeptide Y Differentially Suppresses Per1 and Per2 mRNA Induced by Light in the Suprachiasmatic Nuclei of the Golden Hamster*. *Journal of Biological Rhythms* 17(1):28-39, 2002.
- CABRAL FILHO, J. E.; CASTRO, R. M. and TEODÓSIO, N. E. *Convulsive Hyperresponsives of rats Fed the Basic Regional Diet (BDR)*. In: *International Symposium of Nutrition, Proceedings*. Recife. p. 27, 1986.

CARD, J. P. and MOORE, R. Y. *Organization of Lateral Geniculate- Hypothalamic Connections in the Rat*. The J. of Comparative Neurology. 284: 135-147, 1989.

CASTAÑÓN-CERVANTES, O. and CINTRA, L. *Circadian Rhythms of Occipital-cortex Temperature and Motor Activity in Young and Old Rats Uder Cronic Ptotein Malnutrition*. Nutritional Neuroscience 5:279-286, 2002.

CAVALCANTE, J. S.; ALVES A. S.; COSTA, M. S. M. O. and BRITTO L. R. G. *Differential Distribution of Afferents Containing Serotonin and Neuropeptide Y with the Marmoset Suprachiasmatic Nucleus*. Brain Research 927:200-203, 2002.

CHEVASSUS-AU-LOUIS, N. and COOPER, H. M. *Is There a Geniculohypothalamic Tract in Primates? A comparative Immunohistochemical Study in the Circadian System of Strepsirhine and Haplorhine Species*. Brain Research 805:213-219, 1998.

CINTRA, L.; DURÁN, P.; GUEVARA, M. Angel; AGUILAR, A. and CASTAÑÓN-CERVANTES, O. *Pre- and Post-natal Protein Malnutrition Alters the Effect of Rapid Eye movements Sleep-deprivation by the Platform - Technique upon the Electrocorticogram of the Circadian Sleep-wake Cycle and its Frequency Bands in the Rat*. Nutritional Neuroscience 5(2):91-101, 2002.

CINTRA, L.; GALVÁN, A.; DIAZ-CINTRA, S. and ESCOBAR, C.. *Protein Malnutrition on Suprachiasmatic Nucleus Cells in Rats of Three Ages*. Bol. Estud. Méd. Biol. Méx. 42(1-4):11-19, 1994.

CINTRA, L.; DIAZ-CINTRA, S.; GALVÁN, A. and MORGANE, Peter J. *Circadian Rhythm of Sleep in Normal and Undernourished Rats*. Bol.Estud.Méd.Biol.Méx. 36:3-17, 1988.

CIPOLLA NETO, J.; RECINE, E. G. I. G.; MENNA-BARRETO, L.; MARQUES, N.; AFECHÉ, S.C.; SCHOTT, C.; FORTUNATO, G.; SOTHERN, R. B. and HALBERG, F. *Perinatal Malnutritional, Suprachiasmatic Nuclear Lesioning, and Circadian-Ultradian Aspects of Spontaneous Behavior of Albino Rats*. Advances in Chronobiology (part B):473-489, 1987.

COLMERS, W. F. and BLEAKMAN, D. *Effects of Neuropeptide Y on the Electrical Properties of Neurons*. Elsevier *Tins* . 17 (9): 373-379, 1994.

COLOMBO, M.; PARRA de la, A.; LOPEZ, I. *Intellectual and Physical outcome of Children Undernourished in early Life is Influenced by Later Environmental conditions*. Developmental Medicine and Child Neurology 34: 611-622, 1992.

COSTA, F. B.; COSTA, J. A.; CABRAL FILHO, J. E.; GUEDES, R. C. A. and TEODÓSIO, N. R. *Indicadores de Maduration Nerviosa y Somática em um Modelo Experimental de Desnutrition*. In: Seminário Internacional “Desnutricion y Funciones Cerebrales Superiores”, Resumenes de Conferências e Comunicaciones Libres. Santiago, Universidad de Iãs Naciones Unidas, 1983. p. 89.

COSTA-CRUZ, R. R. G.; GUEDES, R. C. A. *Cortical Spreading Depression During Streptozotocin-induced Hyperglycemia in Nutritionally Normal and Early-Malnourished Rats*. *Neurosc. Letters*. 303, 177-180, 2001.

COUTINHO, E. M. *Relações Hospedeiro-parasita na Esquistosomose Mansônica, em Função da Dieta Básica Regional*. Recife, 1976. 109p. Tese (Livre-Docência) - Universidade Federal de Pernambuco, 1976.

COUTINHO, E. M.; FREITAS, L. P. C. G. e ABATH, F. G. G. *The influence of the Regional Basic Diet from Northeast Brazil on health and Nutritional conditions Mice Infected with Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 25: 13-20, 1992b.

DATTA, S.; PATTERSON, E. H.; VINCITORE, M.; TONKISS, J.; MORGANE, P. J. and GALLER, J. R. *Prenatal Protein Malnourished Rats Show Changes in Sleep-wake Behavior as Adults*. *Journal of Sleep Research*. 9: 71-79.

DESAI, M.; HALES, C.N. *Role of Fetal and Infant Growth in Programming Metabolism in Later Life*. *Biol.Rev.*72: 329-348.

DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, León; GALVÁN, A.; AGUILAR, A; KEMPER, T. and MORGANE, P. J. *Effects of Prenatal Protein Deprivation on Postnatal Development of Granule Cells in the Fascia Dentata*. *The journal of comparative Neurology* 310:356-364, 1991.

EARNEST, D. J. and SLADEK, C. D. *Circadian Rhythms of Vasopressin Release from Individual Suprachiasmatic Explants in Vitro*. *Brain Research* 382:129-133, 1986.

EGWIM, P. O.; CHO, B. H. S. and KUMMEROW, F. A. *Effects of Postnatal Protein Undernutrition on Myelination in Rat Brain*. *Comp.Biochem.Physiol.* 83A:67-70, 1986.

ESCOBAR, C. and SALAS, M. *Ameliorating Effects of Early Sensory Stimulation on the Behavior of Adult Rats Underfed During the Lactating Period*. *Bol. Estud. Méd. Biol. Mex.* 35: 195-202, 1987.

ESCOBAR, C. and SALAS, M.. *Neonatal Undernutrition and Amygdaloid Nuclear Complex Development: An Experimental Study in the Rat*. *Experimental Neurology* 122:311-318, 1993.

ESSEVELDT, L. E. Van; LEHMAN, M. N. and BOER, G. J. *The Suprachiasmatic Nucleus and the Circadian Time-Keeping System Revisited*. *Brain Res. Reviews*. 33: 34-77, 2000.

FISH, I. and WINICK, M. *Effect of Malnutrition on Regional Growth of the developing Rat Brain*. *Exp. Neurol.* 25: 534 – 540, 1969.

FORBES, W.; STERN, W.; TRACY, C. and RESNICK, O. *Effects of Chronic Protein Malnutrition on experimentally Induced Seizures in the Rat*. Exp. Neurol. 62: 475-481, 1978.

FORBES, W. B.; TRACY, C. A.; RESNICK, O. and MORGANE, P. J. *Effect of Protein Malnutrition during Devepment on Sleep Behavior of Rats*. Experimental Neurology 57:440-450, 1977.

FRANKOVÁ, S. *Effects of Protein-calorie Malnutrition on the Development of Social Behavior In Rats*. Dev. Brain Res., 15: 280-282, 1973.

FUKUDA, Y. *A Three-group Classification of Rat Retinal Ganglion Cells: Histological and Physiological Studies*. Brain Research, 119: 327-344, 1977.

FUKUHARA, C.; BREWER, J. M.; DIRDEN, J. C.; BITTMAN, E. L.; TOSINI, G. and HARRINGTON, M. E. *Neuropeptide Y Rapidly reduces Period 1 and Period 2 mRNA Levels in the Hamster Suprachiasmatic Nucleus*. Neurosc. Letters. 314: 119-122, 2001.

GHOSH, P. K.; BASKARAN, N. and VAN DEN POL, A. N. *Developmentally Regulated Gene Expression of all Eight Metabotropic Glutamate Receptors in Hypothalamic Suprachiasmatic and Arcuate Nuclei- A PCR Analysis*. Developmental Brain Research 102:1-12, 1997.

GUEDES, R. C. A.; ANDRADE, A. F. D. and CABRAL FILHO, J. E. *Propagation of Cortical Spreading Depression in Malnourished Rats: Facilitatory Effect of Dietary Protein Deficiency*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 20:639-642, 1987.

GUEDES, R. C. A.; SANTOS- MONTEIRO, J. and TEODÓSIO, N. R. *Malnutrition and Brain Function; Experimental Studies Using the Phenomenon of Cortical Spreading Depression*. Rev.Brasil.Biol. 56(suplemento 1):293-301, 1996.

GÜLDNER, F. H. *Number of Neurons and Asroglial Cells in the Suprachiasmatic Nucleus of Male and Female Rats*. Experimental Brain Research 50:373-376, 1983.

HALL, R. D.; FORBES, W. B. and ROBERTSON, W. M. *The effects of protein malnutrition on the rat's circadian pattern of food and water intake*. Nutr. Rep. Int. 18: 713-720, 1978.

HANNIBAL, J.; DING, J. M.; CHEN, D.; FAHREKRUG, J.; LARSEN, P. J.; GILLETTE, M. U. and MIKKELSEN, J. D. *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) in the Retinohypothalamic Tract: A potential Daytime regulator of the Biological Clock*. The journal of Neuroscience 17(7):2637-2644, 1997.

HATTEN, M. E. and HEINTZ, N.. *Neurogenesis and Migration*. In: Fundamental Neuroscience. Editores: Michael J. Zigmond; Floyd E. Bloom; Story C. Landis; James L. Roberts e Larry R. Squire. Academic Press, 1999.

HEBERT, D. C. and REITER, R. J. *Influence of protein-caloric malnutrition on the circadian rhythm of pineal melatonin in the rat.* Proc. Soc. Exp. Biol. Méd. 166: 360-366, 1981.

HICKEY, T. L. e SPEAR, P. D. *Retinogeniculate Projections in Hooded and Albino Rats: An Autoradiographic Study.* Exp. Brain Res. 24: 523-529, 1976.

IBATA, Y.; TAKAHASHI, Y.; OKAMURA, H.; KUBO, T. and KAWAKAMI, F. *Fine Structure of NPY-containing Neurons in the Lateral Geniculate Nucleus and their Terminals in the Suprachiasmatic Nucleus of the Rat.* Brain Res. 439: 230-235, 1988.

IBATA, Y.; OKAMURA, H.; TANAKA, M.; TAMADA, Y.; HAYASHI, S.; IJIMA, N.; MATSUDA, T.; MUNEKAWA, K.; TAKAMATSU, T.; HISA, Y.; SHIGEYOSHI, Y. and AMAYA, F.. *Functional Morphology of the Suprachiasmatic Nucleus.* Frontiers in Neuroendocrinology 20:241-268, 1999.

IBATA, Y.; TANAKA, M.; TAHASHI, Y. and OKAMURA, H. *Neuron Interaction between VIP and Vasopressin Neurons in the Rat Suprachiasmatic Nucleus.* NeuroReport 4:128-130, 1993.

JANIK, D.; MIKKELSEN, J. D. and MROSOVSKY, N. *Cellular Colocalization of Fos and Neuropeptide Y in the Intergeniculate Leaflet after Nonphotic Phase-Shifting Events.* Brain Research 698:137-145, 1995.

JOHNSON, R. F.; MOORE, R. Y. and MORIN, L. P. *Loss of Entrainment and Anatomical Plasticity after Lesions of the Hamster Retinohypothalamic Tract.* Brain Research 460:297-313, 1988.

JOHNSON, Ralph F.; MORIN, Lawrence P. and MOORE, Robert Y. *Retinohypothalamic Projections in the Hamster and Rat Demonstrated Using Cholera Toxin.* Brain Research 462:301-312, 1988.

KAAS, J.H. and HUERTA, M.F..*The Subcortical Visual System of Primates.* Comp. Primate Biol. 4: 327-391, 1988.

KENNAWAY, D. J. *Programming of the fetal suprachiasmatic nucleus and subsequent adult rhythmicity.* Trends in Endocrinology and Metabolism 13 (9): 398-402, 2002.

LAGO, E. S.; TEODÓSIO, N. R.; PONTES PESSOA, D. C.; CABRAL FILHO, J. E. *Duración de la vida em ratas desnutridas, utilizando dieta básica Del nordeste brasileiro.* Archivos Latinoamericanos de Nutricion. 47: 338-342, 1997.

LAI, M.; LEWIS, P. D. and PATEL, A. J. *Effects of Undernutrition on Gliogenesis and Glial Maturation in Rat Corpus Callosum.* The journal of comparative Neurology 193:965-972, 1980.

LARHAMMAR, D.; WRAITH, A.; BERGLUND, M. M., HOLMBERG, S. K. S. and Lundell, I. *Origins of the many NPY-family Receptors in Mammals*. Peptides. 22: (3), 295-307, 2001.

LEVINE, J. D.; WEISS, M. L.; ROSENWASSER, A. M. and MISELIS, R. R. *Retinohypothalamic Tract in the Female Albino Rat: A Study Using Horseradish Peroxidase Conjugated to Cholera Toxin*. The journal of comparative Neurology 306:344-360, 1991.

LEWIS, P. D.; BALÁZS, R.; PATEL, A. J. and JOHNSON, A. L. *The Effects of Undernutrition in Early on Cell Generation in the Rat Brain*. Brain Res. 893: 235-247, 1975.

LIMA, J. G.. *Estudo Morfológico e Morfométrico do Corpo Caloso de Ratos Submetidos a Diferentes Tipos de Estimulação Sensorial e Ambiental*. Ribeirão Preto, 1992, 104p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1992.

LIMA, J. G.; OLIVEIRA, L. M.; LACHAT, J. J.; DAL-BO, C. M. R. and ALMEIDA, S. S. *Comparison of the Effects of Lab Chow and Casein Diets Based on Body and Brain Development of Rats*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 26:1069-1076, 1993.

MARQUES, N. e MENNA-BARRETO, L. (Orgs.) *Cronobiologia Princípios e Aplicações*. São Paulo-SP: EDUSP, 321p.

MENET, J.; VUILLEZ, Patrick; JACOB, Nathalie and PÉVET, Paul. *Intergeniculate Leaflets Lesion Delays but does not Prevent the Integration of Photoperiodic Change by the Suprachiasmatic Nuclei*. Brain Research 906:176-179, 2001.

MICHELL, S. and COLWELL, C. S. *Cellular Communication and Coupling Within the Suprachiasmatic Nucleus*. Chronobiology International 18(4):579-600, 2001.

MOFFET, J. R.; WILLIAMSON, L.; PALKOVITS, M. e NAMBOODIRI, M. A. A. *N-acetylaspartilglutamate: A Transmitter Candidate for the Retinohypothalamic Tract*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8065-8069, 1990.

MOGA, M. M. e MOORE, R. Y. *Putative Excitatory Amino Acid Projections to the Suprachiasmatic Nucleus in the Rat*. Brain Res. 743; 171-177,1996.

MOORE, R. Y. *The Genuculohypothalamic Tract in Monkey and Man*. Brain Res. 486: 190-194, 1989.

MOORE, R. Y. and BERNSTEIN, M. E. *Synaptogenesis in the Rat Suprachiasmatic Nucleus Demonstrated by Electron Microscopy and Synapsin I Immunoreactivity*. J. Neurosci. 9: 2151-2162, 1989.

MOORE, R. Y. "The Organization of the Human Circadian Timing System". In: D.F. Swaab, M. A.; Hofman, M.; Miriran R. Ravid, Leeuwen (eds.) *The Human Hypothalamus in Health and Disease: Proceedings of the 17th International Summer School of Brain Research*. Elsevier Science. Cap. 8, p. 101-117 (Progress in Brain Res. V. 93), 1992.

MOORE, R. Y. *Development of the Suprachiasmatic Nucleus*, In: D.C.Klein, R.Y. Moore and S.M. Reppert (eds.), *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*. Oxford University Press, New York, pp. 391-404, 1991.

MOORE, R. Y.; GUSTAFSON, E. L. and CARD, J. P. *Identical Immunoreactivity of Afferents to the Rat Suprachiasmatic Nucleus with Antisera Against Avian Pancreatic Polypeptide, Molluscan Cardioexcitatory Peptide and Neuropeptide Y*. Cell Tissue Res. 236 41-46, 1984.

MOORE, R. Y.; SPEH, Joan C. and CARD, J. Patrick. *The Retinohypothalamic Tract Originates from a Distinct Subset of Retinal Ganglion Cells*. The journal of comparative Neurology 352:351-366, 1995.

MORGANE, P. J.; MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, W.; HALL, R.; BRONZINNO, J.; KISSANE, J.; HAWRYLEWICZ, E. and RESNICK, O .. *The Effects of Protein Malnutrition on the Developing Central Nervous System in the Rat*. Neurosci. Bio-Behav. Rev. 2: 137-230, 1978.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T. and GALLER, J. R. *Prenatal Malnutrition and Development of the Brain*. Neuroscience and Behavioral Reviews 17:91-128, 1993.

MORIN, L. P. *The Circadian Visual System*. Brain Research Reviews 67:102-127, 1994.

MORIN, L. P.; JOHNSON, R. F. and MOORE, R. Y. *Two Brain Nuclei Controlling Circadian Rhythms Are Identified by GFAP Immunoreactivity in Hamsters and Rats*. Neuroscience Letters 99:55-60, 1989.

MORLEY, R. and LUCAS, A. *Nutritional and cognitive Development*. British Medical Bulletin. 53 (1): 123-134, 1997.

MUNEKAWA, K.; TAMADA, Y.; IIJIMA, N.; HAYASHI, S.; ISHIHARA, A .; INOUE, K.; TANAKA, M. and IBATA, Y.. *Development of Astroglial Elements in the Suprachiasmatic Nucleus of the Rat: With Special Reference to the involvement of the Optic nerve*. Experimental Neurology 166:44-51, 2000.

ONIS, M. de; MONTIERO, C.; AKRÉ, J. and CLUGSTON, G. *The worldwide Magnitude of Protein-energy Malnutrition: on Overview from the WHO global Database on Child Growth*. Bulletin of World Health Organization 71: 703-712.

PAIXÃO, A. D. O.; NUNES, F. A.; MONTEIRO, J. C. AND MACIEL, C. R. *Low Sodium Chloride Content in a Multideficient Diet Induces Renal Vasodilatation in Rats*. Nutrition Research. 23: 85-89, 2003.

PARK, H. T.; BAEK, S. Y.; KIM, J. B. and KIM, J. J. *Calcitonin Gene Related Peptide-like Immunoreactive (CGRPI) Elements in the Circadian System of the mouse: an Immunohistochemistry Combined with Retrograde Transport Study*. Brain Res., 629 335-341, 1993.

PICANÇO-DINIZ, C. W.; ARAÚJO, M. S.; BORBA, J. M. C. and GUEDES, R. C. A. *NADPH-Diaphorase Containing Neurons and Biocytin-labelled Axon Terminals in the Visual Cortex of Adult Rats malnourished During Development*. Nutritional Neuroscience 1:35-48, 1998.

PICKARD, G. E. *Bifurcation Axons of Retinal Ganglion Cells Terminate in the Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus and the Intergeniculate Leaflet of the Thalamus*. Neuroscience Letters 55:211-217, 1985.

PICKARD, G. E. *Morphological Characteristics of Retinal Ganglion Cells Projecting to the Suprachiasmatic Nucleus: A Horseradish Peroxidase Study*. Brain Research 183:458-465, 1980.

PONTES PESSOA, D. C. N. de; LAGO, E. S.; TEODÓSIO, N. R. and BION, F. M. *Dietary Proteins on Reproductive Performance in three Consecutive Generations of Rats*. Arch. Lat.-Americanos de Nutricion. 50(1): 55-61, 2000.

PROSSER, R. A. *Neuropeptide Y Blocks Serotonergic Phase-Shifts of the Suprachiasmatic Circadian Clock in Vitro*. Brain Research 808(1):31-41, 2003.

PROSSER, R. A.; EDGAR, D. M.; HELLER, H. C. and MILLER, J. D. *A Possible Glial Role in the Mammalian Circadian Clock*. Brain Research 643:296-301, 1994.

ROBAIN, O. and PONSOT, G. *Effects of Undernutrition on Glial Maturation*. Brain Research 149:379-397, 1978.

ROCHA DE MELO, A. P. and GUEDES, R. C. A. *Spreading Depression is Facilitated in Adult Rats Previously Submitted to Short Episodes of Malnutrition During The Lactation Period*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 30:663-669, 1997.

SALAS, M. and CINTRA, L. *Undernutrition and Novelty Responses. Influence of Early Food Restriction on the responsiveness to Novel Stimuli in Adult Rats*. Bol. Estud. Méd. Biol. Mex., 30: 201-204, 1979.

SALAS, M. *Privación neonatal de alimento y desarrollo cerebral: aspectos morfológicos, conductuales y eletrofisiológicos*. Bol. Estud. Méd. Biol., Méx. 30: 111-124, 1978.

SALAS, M.; RUIZ, C.; TORRERO, C. and PULIDO, S.. *Neonatal Food Restriction: Its Effects on the Sleep Cycles and Vigil Behavior of Adult Rats*. Bol. Estud. Méd. Biol. Méx. 32: 209-215, 1983.

SANTOS-MONTEIRO, J.; TEODÓSIO, N. R. and GUEDES, R. C. A. *Long-lasting Effects of Early Environmental Stimulation on Cortical Spreading Depression in Normal and Early Malnourished Adult Rats*. *Nutritional Neurosc.* 3; 29-40, 2000.

SHARMA, S. K.; NAYAR, U.; MAHESHQARI, M. C. and SINGH, B. *Effects of Undernutrition on Developing Rat Cerebellum: Some Electrophysiological and Neuromorphological Correlates*. *J. Neurol. Sci.*, 78: 261-272, 1987.

SHINOHARA, K.; TOMINAGA, K.; FUKUHARA, C.; OTORI, Y. and INOUE, S. I. T. *Processing of Photic Information within the Intergeniculate Leaflet of the Lateral Geniculate Body: Assessed by Neuropeptide Y Immunoreactivity in the Suprachiasmatic Nucleus of Rats*. *Neurosc.* 56: 813-822, 1993.

SHINOHARA, K. and INOUE, S. T. *Photic Information Coded by Vasoactive Intestinal Polypeptide and Neuropeptide Y*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19(3):349-352, 1995.

SIKES, R. W.; FULLER, G. N.; COLBERT, C.; CHRONISTER, R. B.; DE FRANCE, J. and WIGGINS, R. C. *The Relative Numbers of Oligodendroglia in Different Brain Regions of Normal and Postnatally Undernourished Rats*. *Brain Research Bulletin* 6:385-391, 1981.

SILVA, A. T. da; COSTA, F. B. R.; COSTA, J. A.; TEODÓSIO, N. R.; CABRAL FILHO, J. E. and GUEDES, R. C. A. *Sciatic Nerve Conduction Velocity of Malnourished Rats Fed the Human "Basic Regional Diet" of the Northeast of Brazil*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 20: 383-392, 1987.

SPEH, J. C. and MOORE, R. Y. *Retinohypothalamic Tract Development in the Hamster and Rat*. *Developmental Brain Research* 76:171-181, 1993.

STOPA, E. G.; VOLICER, L.; KUO-LEBLANC, V.; HARPER, D.; LATHI, D.; TATE, B. and SATLIN, A. *Pathologic Evaluation of the Human Suprachiasmatic Nucleus in Severe Dementia*. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 58: 29-39, 1999.

TAKATSUJI, K.; OYAMADA, H. and TOHYAMA, M. *Postnatal Development of the Substance-P, Neuropeptide-Y and Serotonin-Containing Fibers in the Rat Suprachiasmatic Nucleus in Relation to Development of the Retino Hypothalamic Projection*. *Developmental Brain Research* 84:261-270, 1995.

TAMADA, Y.; TANAKA, M.; MUNEKAWA, K.; HAYASHI, S.; OKAMURA, H.; KUBO, T.; HISA, Y. and IBATA, Y. *Neuron-Glia Interaction in the Suprachiasmatic Nucleus: A Double Labeling Light and Electron Microscopic Immunocytochemical Study in the Rat*. *Brain Research Bulletin* 45(3):281-287, 1998.

TATEMOTO, K.; CARLQUIST, M. and MUTT, V. *Neuropeptide Y- A Novel Brain Peptide with Structural Similarities to Peptide YY and Pancreatic Polypeptide*. *Nature* 296:659-660, 1982.

TEODÓSIO, N. R.; LAGO, E. S.; ROMANI, S. A. M and GUEDES, R. C.A.. *A Regional Basic Diet from Northeast Brazil as a Dietary Model of Experimental Malnutrition*. Archivos latinoamericanos de nutricion 4:533-547, 1990.

UEDA, S.; MATSUMOTO, Y.; NISIMURA, A.; AZMITIA, E. C. and KAWATA, M.. *Role of Neuropeptide Y on the Development of Seronegic Innervation in the Suprachiasmatic Nucleus of the Rat, Shown by Triple Intraocular Grafts*. Brain Research 673:325-330, 1995.

VAN DEN POL, A .N.; and TSUJIMOTO, K. L. *Neurotransmitters of Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus: Immunocytochemical Analysis of 25 Neuronal Antigens*. Neuroscience. 15: 1049-1089, 1985.

VAN DEN POL, A. N. *The Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus of Rat: Intrinsic Anatomy*. The journal of comparative Neurology 191:661-702, 1980.

VITATERNA, M. H.; TAKAHASHI, J. S. e TUREK, F. W. *Overview of Circadian Rhythms*. Alcohol Research and Health 25: 85-93, 2001.

WATTS, A. G. e SWANSON, L. W. *Efferent Projections of the Suprachiasmatic Nucleus II Studies Using Retrograde Transport of Fluorescent Dyes and Simultaneous Peptides Immunohistochemistry in the Rat*. J. Comp. Neurol. 258: 230-252,1987.

WEAVER, D. R. *The Suprachiasmatic Nucleus: A 25-Year Retrospective*. Journal of Biological Rhythms 13(2):100-112, 1998.

WEST, C. D. and KEMPER, T. L. *The Effects of a Low Protein Diet on the Anatomical Development of the Rat Brain*. Brain Res. 107: 221-237, 1976.

WHATSON, T.; SMART, J. and DOBBING, J. *Undernutrition in a Early Life: Lasting Effects on Activity and Social Behavior of Male and Female Rats*. Dev. Psychobiol., 10: 243-254, 1976.

WIENER, S. G.; ROBINSON, L. and LEVINE, Seymour. *Influence of Perinatal Malnutrition on Adult Physiological and Behavioral Reactivity in Rats*. Physiology and Behavior 30:41-50, 1983.

WOLF, C.; ALMLI, C. R.; FINGER, S. and MORGANE, P. J. *Behavior Effects of Severe and Moderate Early Malnutrition*. Physiol. Behav., 38: 725-730, 1986.

WOODHAMS , P. L.; ALLEN, Y. S.; MCGOVERN, J.; ALLEN J. M.; BLOOM, S. R.; BALAZS, R. and POLAK, J. M. *Immunohistochemical Analysis of the Early Ontogeny of the Neuropeptide Y System in Rat Brain*. Neuroscience. 15: 173-202, 1985.

YANNIELLI, P. C. and HARRINGTON, M. E. *Neuropeptide Y in the Mammalian Circadian System: Effects on Light-induced Circadian Responses*. Peptides. 22 (3): 547-556, 2001.

ANEXO A - MATERIAIS E MÉTODOS

D) ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos Wistar, machos e fêmeas, nascidos e criados no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, sob um ciclo claro-escuro de 12 h (luz ligada às 6h), temperatura de $23 \pm 03^{\circ}$ C e umidade relativa do ar de aproximadamente de 65%.

Todos os procedimentos experimentais adotados com os animais, desde a sua procriação até o momento da eutanásia, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (Documento em anexo).

Todas as ninhadas foram obtidas a partir do acasalamento de 3 fêmeas nulíparas (idade variando de 90 a 120 dias) com um macho adulto (idade superior a 90 dias) durante dez dias, quando então as fêmeas, possivelmente grávidas, eram colocadas em gaiolas individuais (gaiolas-maternidade).

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o dia 0 (zero). Neste dia ou após 24 h do nascimento a ninhada era reduzida para seis filhotes, sendo três machos e três fêmeas, os quais eram mantidos com as mães durante todo o período de aleitamento. Os filhotes descartados durante a redução da ninhada ou foram utilizados em pesquisas de outros laboratórios, ou foram sacrificados por congelamento, acondicionados em sacos plásticos, de acordo com o recomendado como forma de eutanásia para animais recém-nascidos. A redução da ninhada para 06 filhotes foi usada como padrão para que a competição pelas mamas não precisasse acontecer e o modelo de desnutrição adotado assumisse papel único como desencadeador das possíveis alterações induzidas pela dieta.

O desmame para todos os ratos experimentais foi feito no 25º dia de vida, quando então os filhotes foram separados em gaiolas diferentes de acordo com o sexo e permaneceram alimentados *ad libitum* com água e com as mesmas dietas que vinham sendo fornecidas às mães até a idade estabelecida para o sacrifício.

II) GRUPOS EXPERIMENTAIS E DIETAS

De acordo com o tipo de dieta administrada e com a idade na qual foram analisados, os animais foram subdivididos nos seguintes grupos e subgrupos:

II.1) GRUPO CONTROLE– C (n=95)

Grupo no qual a dieta fornecida *ad libitum* foi a dieta comercial Labina (Agribandis Purina do Brasil Ltda.). Neste grupo as mães foram alimentadas com esta dieta durante todo o período de gestação e aleitamento e os filhotes receberam a mesma dieta durante o período pós desmame até a idade de 30 a 33 dias - subgrupo denominado **C 30** (controle 30 dias) - ou 60 a 63 dias - subgrupo denominado **C 60** (controle 60 dias) - quando então foram utilizados experimentalmente.

II.2) GRUPO DESNUTRIDO 1

Grupo desnutrido cronicamente desde a gestação– GLA (n=80)

Neste grupo a dieta fornecida *ad libitum* foi a Dieta Básica Regional – DBR fornecida às mães a partir do segundo dia do acasalamento até o período do desmame. A partir de então esta dieta foi fornecida aos filhotes até a idade de 30 a 33 dias- subgrupo denominado **GLA 30** - ou de 60 a 63 dias compondo assim o subgrupo **GLA 60**.

II.3) GRUPO DESNUTRIDO 2

Grupo desnutrido cronicamente a partir do aleitamento– LA (n=83)

Neste grupo a dieta fornecida *ad libitum* também foi a Dieta Básica Regional (DBR), porém esta só foi fornecida às mães partir da data do nascimento dos filhotes e foi mantida para estes do período pós-desmame até a idade de 30 a 33 dias - subgrupo **LA 30** - ou de 60 a 63 dias - subgrupo **LA 60**.

Em todos os casos experimentais, as mães, por ocasião dos desmames no 25º dia de vida dos filhotes, foram colocadas em gaiolas para repouso no caso de serem

necessárias para outros experimentos do Departamento ou foram sacrificadas com dose excessiva de anestésico para posterior cremação.

A **TABELA 1** resume a descrição dos grupos e subgrupos utilizados no presente trabalho.

TABELA 1 - Descrição dos Grupos experimentais utilizados

<i>GRUPOS (Subgrupos)</i>	<i>SIGLA</i>	<i>N</i>	<i>DIETA</i>	<i>DESCRIÇÃO</i>
Controle	C (total)	95	LABINA	Normonutrido desde o acasalamento
	C 30	50		
	C 60	45		
Desnutrido 1	GLA (total)	80	DBR	Desnutrido desde o acasalamento
	GLA 30	28		
	GLA 60	52		
Desnutrido 2	LA (total)	83	DBR	Desnutrido desde o aleitamento
	LA 30	52		
	LA 60	31		

III) CONFECCÃO DA DIETA MULTIDEFICIENTE E COMPOSIÇÕES DAS DIETAS EXPERIMENTAIS

III.1) CONFECCÃO DA DIETA BÁSICA REGIONAL

A DBR é constituída dos seguintes elementos (Composição para 1 Kg de ração): 183,4 g de feijão, 37,4 g de charque, 127,6 g de batata doce, 648,1g de

farinha de mandioca e 3,5 g de gordura. O feijão é cozido em pouca água até que não reste mais caldo e em seguida é desidratado em estufa (60⁰ C) por um período de 24h. A charque é separada de sua gordura, escaldada e desidratada também em estufa (60⁰ C) por um período de 24 h. A batata doce é cozida com a casca, em pouca água. Em seguida a casca é retirada, e a batata cortada em fatias finas e desidratada em estufa (60⁰ C) por 48 h.

O produto resultante da desidratação do feijão, da batata doce e da charque são moídos separadamente e em seguida misturados e reservados. A farinha de mandioca e a gordura são misturadas e em seguida todos os ingredientes são homogeneizados na presença de 800ml de água destilada até obter-se uma pasta. Essa mesma pasta é amassada e fatiada em pequenos blocos que a seguir são desidratados numa estufa a 60°C durante 24 horas. A **TABELA 2** expressa as composições centesimais desta dieta, de acordo com análise realizada pelo Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Pernambuco, Brasil.

III.2) COMPOSIÇÃO DA DBR

TABELA 2 – Composição centesimal da dieta DBR

Ingredientes	g%	Composição centesimal							
		Proteínas	Carboidratos	Gordura	Cinzas	Fibras	VHS	VLS	Kcal%
Feijão	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09	-	-	60,76
Farinha de mandioca	64,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64	-	-	198,80
Carne de charque	3,74	2,74	--	0,06	0,06	--	-	-	11,50
Gordura de charque	0,35	-	-	0,35	-	-	-	-	3,15
Batata doce	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48	-	-	41,43
TOTAL	100	7,87	69,24	0,80	1,26	7,21	-	-	315,64

III.3) COMPOSIÇÃO DA DIETA COMERCIAL LABINA

No decorrer desta pesquisa, a ração comercial Labina foi modificada pela empresa que a produz. As composições dos dois tipos de Labina utilizadas se apresentam nas tabelas 3 e 4 com dados fornecidos pela Agribandis Purina do Brasil Ltda..

TABELA 3 - Composição da dieta controle / LABINA peletizada

Composição Básica: Milho, Farelo de Trigo, Farelo de Soja, Farinha de Carne, Farelo de Arroz Cru, Carbonato de Cálcio, Fosfato Bicálcico, Sal e Pré-Mix.

Enriquecido por Kg de Ração:

Vitamina A	20.000 UI
Vitamina D3	6.000 UI
Vitamina E	30 UI
Vitamina K	6 mg
Vitamina B12	10 µg
Vitamina B	8 mg
Pantotenato de Cálcio	24 mg
Niacina	95 mg
Tiamina	4 mg
Colina	2.000 mg
Piridoxina	6 mg
Biotina	0,1 mg
Ácido Fólico	0,5 mg
Manganês	50 mg
Iodo	2 mg
Ferro	65 mg
Zinco	35 mg
Cobre	26 mg
Anti-oxidante	100 mg
Níveis de Garantia	
Umidade (máx.)	13,0 %
Proteína (min.)	23,0 %
Extrato Teérico (min.)	2,5 %
Matéria fibrosa (max.)	9,0 %
Matéria mineral (max.)	8,0 %
Cálcio (max.)	1,8 %
Fósforo (min.)	0,0 %

TABELA 4 – Composição da dieta controle / LABINA extrusada

Composição Básica: Milho Integral Moído, Farelo de Trigo, Farelo de Soja, Farinha de Peixe, Carbonato de Cálcio, Fosfato Bicálcico, Feno de Alfafa, Óleo de Soja Degomado, cloreto de sódio (sal comum) PREMIX vitamínico mineral.

Eventuais Substitutos: farelo de arroz, farelo de arroz desengordurado, farelo de glúten de milho-60, farelo de soja integral (grãos tostados), quirera de arroz, ETOXIQUIM, gordura vegetal estabilizada e farinha de trigo

Enriquecido por Kg de Ração:

Vitamina A	28.000 UI
Vitamina D3	4.400 UI
Vitamina E	90 UI
Vitamina K	7 mg
Vitamina B12	44 µg
Vitamina B2	13 mg
Pantotenato de Cálcio	100 mg
Niacina	242 mg
Tiamina	12 mg
Colina	28.000 mg
Piridoxina	6 mg
Biotina	0,20 mg
Piridoxina	12 mg
Ácido Fólico	14 mg
Manganês	110 mg
Iodo	2 mg
Ferro	180 mg
Zinco	110 mg
Cobre	0 mg
Selênio	0,20 mg
Cobalto	2 mg
Anti-oxidante	150 mg

Níveis de Garantia

Umidade (máx.)	13,0 %
Proteína (min.)	23,0 %
Extrato Teérico (min.)	4%
Matéria fibrosa (max.)	8,0 %
Matéria mineral (max.)	10,0 %
Cálcio (max.)	1,5 %
Fósforo (min.)	0,8 %

IV) MARCAÇÃO DO TRATO RETINO- HIPOTALÂMICO

IV.1) INJEÇÕES INTRAOCULARES

Os animais selecionados para avaliação do TRH foram dos grupos C30, GAA30 e AA30 nos quais foram feitas injeções intraoculares unilaterais (olho direito) da subunidade β de toxina colérica (SIGMA ou List Biological Laboratories, Inc., Campbell, CA). Esses ratos foram anestesiados com Pentobarbital sódico (Crystalia^R, São Paulo, Brasil) por via intraperitoneal (dose: 60 – 80 mg/kg para normonutridos e 30 - 40 mg/Kg para os desnutridos), e em seguida procedeu-se a injeção intraocular de 10 μ l (em desnutridos) e 15 μ l (em normonutridos) de solução aquosa de toxina colérica na concentração de 1mg/ml. Após sobrevida de 03 a 05 dias os animais foram reanestesiados com pentobarbital (60-100 mg/Kg i.p.) e perfundidos por via transcardíaca para fixação do tecido cerebral, e preparados para análise imunohistoquímica a partir da utilização de um anticorpo policlonal anti-subunidade β de toxina colérica (SIGMA) .

IV.2) PERFUSÃO DOS ANIMAIS E PROCESSAMENTO DOS ENCÉFALOS

Protocolo de Fixação, Pesagem e Secção do Tecido Cerebral

1- Perfusão: Com o animal profundamente anestesiado, foi feita uma toracotomia, para exposição do coração seguida de aplicação transcardíaca de 0,02 ml de heparina sódica (Bérghamo, 5000 UI/ml). Imediatamente, procedeu-se a perfusão com 20ml (em desnutridos) e 40 ml (em normonutridos) de NaCl 0,9%, seguida de uma solução fixadora de paraformaldeído 4% (PA) em tampão fosfato (TF) 0,1 M, pH 7,4. A perfusão foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão contínua (Harvard Apparatus) com fluxo de 3,82 e 7,64 ml/min para animais com pesos até 100 gramas e maior que 100 gramas, respectivamente.

2- Pesagem dos cérebros Após o período de perfusão, os cérebros foram removidos, imersos em PA 4% em TF por um período adicional de 02 horas e em seguida lavados abundantemente em TF 0,1M (5 trocas) e mantidos à temperatura de

4°C. Cada cérebro foi pesado em Balança Analítica (Mettler) após remoção dos bulbos olfatórios, cócleas e da medula espinhal sendo a secção feita no limite inferior do bulbo. Previamente à pesagem, os cérebros foram colocados sobre papel toalha para retirada do excesso de água do tecido. Foi padronizado um período de 40 min para esta etapa prévia à pesagem.

3- Crioproteção e secção do encéfalo A crioproteção foi realizada por imersão sucessiva dos encéfalos em soluções de sacarose a 10, 20 e 30% em TF 0,1M para finalmente serem submetidos ao congelamento e seccionados no plano coronal em micrótomo de congelação (Leitz Weitzlar). As secções foram feitas com espessura de 50µm e mantidas em TF 0,1M, pH 7,4 a temperatura de 04°C até sua utilização para os procedimentos imunohistoquímicos. Quando estes procedimentos não puderam ser realizados imediatamente, as secções cerebrais foram colocadas em solução crioprotetora (contendo em 500 ml: 150ml de glicerol, 150 ml de etileno glicol, 150 ml de água e 50 ml de tampão fosfato 0,2 M) e mantidas a -20° C para posteriores procedimentos imunohistoquímicos.

V - PROCEDIMENTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS PARA EVIDENCIAR OS TRATOS RETINO- E GENÍCULO-HIPOTALÂMICOS

O trato genículo-hipotalâmico contendo NPY foi também analisado em secções coronais do encéfalo obtidas de forma similar ao descrito na seção IV.2 e processadas para imunohistoquímica utilizando-se um anticorpo policlonal feito em coelho contra o NPY (SIGMA). A seguir descreveremos os procedimentos imunohistoquímicos adotados para a visualização dos tratos retino- e genículo-hipotalâmicos:

Protocolo para os procedimentos imunohistoquímicos

1- Tratamento inicial para recuperação antigênica: Incubação dos cortes contendo o NSQ em tampão citrato, 0,01 M, pH 6.0, durante 02 h na estufa a 60°C. Os cortes que continham o FIG tiveram a sua recuperação antigênica feita em forno microondas, em potência máxima, por 1 minuto, também imersos em tampão citrato.

2 - Lavagens dos cortes com TF 0,1 M, (03 vezes de 10 minutos).

3- Pré-incubação em soro normal de cabra (SNC) 10%. Este procedimento foi feito para a marcação do NPY uma hora antes da incubação do anticorpo primário

4- Incubação nos anticorpos primários:

Para *anti-toxina colérica*: concentração de 1:5000 com SNC 2% em tampão fosfato + triton X-100 0,3% (TXTF) durante 48 horas na geladeira.

Para *anti-NPY no NSQ*: concentração de 1:8000 com SNC 1% em TXTF durante 72 horas na geladeira.

Para *anti-NPY no FIG* concentração de 1:6000 com SNC 2% em TXTF durante 72 horas na geladeira.

5- Lavagens dos cortes com TF (3 vezes de 10 minutos).

6- Incubação no anticorpo secundário – anticorpo biotilado contra a espécie em que foi obtido o anticorpo primário (cabra X coelho). Diluição:1:200 em TXTF, durante uma hora e 30 minutos à temperatura ambiente.

7- Lavagens dos cortes com TF, (03 vezes de 10 minutos).

8-Incubação no complexo ABC (Avidina-Biotina-Peroxidase): Diluição: 1:100 em TXTF. Tempo de incubação de uma hora e 30 minutos à temperatura ambiente.

9- Lavagens dos cortes com TF, (03 vezes de 10 minutos).

10- Reação: Alíquotas de 25 mg DAB (3,3'-Diamino Benzidina) foi dissolvido em 01 ml de TF 0,1M. Secções coronais contendo as regiões hipotalâmicas e talâmicas foram colocadas em peneiras e imersas em 100 ml de TF 0,1M contendo a alíquota de DAB. Nesta solução os cortes foram imersos durante 20 minutos com agitação suave e a seguir foi adicionado o Peróxido de Hidrogênio P.A. por 10 minutos.

11- Lavagens dos cortes com TF (03 vezes de 10 minutos.)

12- Montagem em lâminas gelatinizadas.

13-Desidratação e diafanização dos cortes com posterior colocação das lamínulas com o meio Bálsamo de Canadá.

VI) PROCEDIMENTO HISTOQUÍMICO PARA ANÁLISE DO NSQ

Para analisar os limites citoarquitetônicos do NSQ, cortes alternados do cérebro aos que foram processados para a reação imunohistoquímica foram dispostos em lâminas gelatinizadas e 24 horas após, foram processados pela técnica de coloração de Nissl. Para tanto foi cumprido o seguinte protocolo:

Protocolo utilizado para coloração pelo método de Nissl

- 1- Ácido acético** 3% em álcool por 5 a 10 minutos.
- 2- Cresil violeta** 0,25% por 20 minutos (ou mais, até os cortes apresentarem uma coloração uniforme).
- 3- Desidratação:**
 - 3.1- Álcool 70% em água destilada por 15 segundos.
 - 3.2- Álcool 90% em água destilada por 15 segundos.
 - 3.3- Álcool 100% por 1 minuto.
 - 3.4- Álcool 95% por 15 segundos.
 - 3.5- Álcool 100% por 1 minutos (duas mudanças).
- 4- Diafanização:**
 - 4.1- Xilol por 90 segundos (duas mudanças)
- 5- Montagem em lamímulas** com o meio Bálsamo de Canadá e condicionamento em caixas para posterior análise.

VII) PROCESSAMENTO DAS RETINAS

Após cada animal ter sido perfundido com salina e fixador, seus globos oculares foram marcados para orientação no tecido conjuntivo do lado temporal. Em seguida, foi feita a enucleação e os olhos foram imersos em uma solução de tampão fosfato 0,1M. Neste tampão fosfato, com ajuda de uma lupa cirúrgica, foi removida a câmara anterior do olho, procedendo a dissecação das retinas as quais foram aplanadas e montadas em lâminas gelatinizadas. Após devidamente aderidas às lâminas, as retinas foram coradas pelo método de Nissl com Cresil Violeta, de acordo com o protocolo a seguir:

Protocolo utilizado para marcação com Cresil Violeta:

- 1- Imersão em ácido acético 3%** em álcool por 30 minutos.
- 2- Coloração com Cresil violeta 0,1%**, à temperatura de 50 a 60°C por 2 minutos
- 3- Lavagem** em água destilada
- 4- Desidratação:**
 - 4.1- Álcool 70% em água destilada por 30 segundos.
 - 4.2- Álcool 90% em água destilada por 30 segundos.
 - 4.3- Álcool 100% por 1 minuto.
 - 4.4- Éter-clorofórmio-álcool (misturados numa concentração de 1:6:1) por 2 minutos.
 - 4.5- Álcool 90% por 15 segundos (2 mudanças)
 - 4.6- Álcool 100% por 3 minutos (duas mudanças).
 - 4.7- Álcool butílico por 3 minutos.
- 5- Diafanização:**

Xilol por 3 minutos (duas mudanças)

6-Montagem em lamímulas com o meio Bálsamo de Canadá

A análise do nível de retração devido ao procedimento de coloração foi feita a partir de imagens escaneadas das montagens planas antes e após a coloração e desidratação. Em alguns animais, a análise da retração devida à perfusão foi feita procedendo-se a enucleação de um dos olhos em um dos olhos

VIII) ANÁLISE DOS DADOS

VIII.1) ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TERMINAIS NEURONAIIS IMUNORREATIVOS AO NPY E À TOXINA COLÉRICA NO NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

Utilizando-se um microscópio trinocular DMLS Leica (objetiva de 4x) munido de uma microcâmera Samsung, foram obtidas imagens digitalizadas coloridas da região hipotalâmica contendo o NSQ e dos terminais neuronais de fibras retino e genículo-hipotalâmicas. Para obtenção destas imagens foi utilizado um software

denominado Image-Lab (Roberto Barros) pertencente ao Departamento de Anatomia, Mestrado em Morfologia da UFPE, o qual permitiu também análise de parâmetros morfométricos e de densidade óptica. As imagens de cada grupo experimental foram obtidas com o mesmo nível de iluminação e comparadas entre si para que mantivessem a mesma proporção de densidade óptica global nas cores azul, vermelho e verde. Foram analisados o padrão geral de imunorreatividade, os níveis de densidade óptica bem como parâmetros morfométricos incluindo a área, diâmetros máximo e mínimo ocupados pelos terminais neuronais no NSQ. Devido às variações nas dimensões encefálicas observadas entre os animais jovens dos diferentes grupos experimentais, e considerando a inexistência de um atlas estereotáxico para ratos desnutridos, foram utilizados para a realização das análises, os Atlas Estereotáxicos de Paxinos e Watson (1986) e de Sherwood e Timiras (1970) no sentido de definir a orientação correta das estruturas ao longo das secções coronais, tendo sido excluídas da análise as secções que apresentaram orientações erradas. Para a análise morfométrica foi escolhida a coordenada estereotáxica equivalente ao nível médio do NSQ (figura 23 de Paxinos e Watson, 1986) e página 157 de Sherwood e Timiras (1970) para animais maiores e menores respectivamente.

VIII.2) ANÁLISE DO FOLHETO INTERGENICULADO DO TÁLAMO

O procedimento para captação das imagens foi feito através do mesmo procedimento descrito acima, porém com o uso de uma objetiva de 20 x e 40 x para análise das células imunorreativas ao NPY ao longo da extensão rostro-caudal do FIG. Medidas de parâmetros morfométricos destas células foram realizadas sempre pelo mesmo examinador, sendo algumas secções analisadas também por uma segunda pessoa no sentido de testar a similaridade dos resultados obtidos.

VIII.3) ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA

As montagens planas das retinas foram observadas em microscopia óptica e desenhadas em papel milimetrado, com auxílio de um scanner (TCÊ S-440), em uma ampliação equivalente a sete vezes o tamanho original. Tal desenho esquemático

teve como finalidade a localização topográfica dos pontos de amostragem, onde foi analisada a densidade de neurônios ganglionares bem como a medida da área retiniana. As medidas de área foram obtidas utilizando-se o programa Scion Image for Windows, o que permitiu também a análise dos níveis de retração devidos à perfusão, coloração e desidratação do tecido durante o processo de coloração pelo método de Nissl. Retinas que apresentaram níveis de retração em área superiores a 10% ou dobras foram excluídas da análise. Para a identificação das células ganglionares foram adotados os critérios descritos em Stone (1981).

Toda análise foi realizada diretamente a partir do tecido retiniano, com a utilização de um fotomicroscópio Dialux 20 EB (Leitz Wetzlar) e objetiva de 100 x bem como a partir de imagens digitalizadas. Os campos de amostragem foram selecionados ao longo de todo o tecido retiniano a intervalos regulares de 0,5 mm na retina mais central e de 1 mm nas demais regiões, em uma área equivalente a 0,01538 mm². A partir dos valores absolutos foram estimados valores de densidade (células/mm²), e linhas de isodensidade foram traçadas para análise da distribuição topográfica das células.

IX) TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para análise estatística dos resultados utilizamos o Teste t de Student para variáveis independentes, o qual permitiu a comparação entre os grupos experimentais e controle de idades similares e dietas correspondentes, análise de variância (ANOVA, one way) e teste de Tukey *post hoc*; e teste Student Newman-Keuls para comparações múltiplas. A significância estatística foi estabelecida admitindo-se um nível crítico de $p < 0.05$ para rejeição da hipótese nula.

X) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SHERWOOD, N.M. and TIMIRAS, P. S.. *A Stereotaxic Atlas of the Developing Rat Brain*. Los Angeles, California:University of California Press, Ltd., 1970.

PAXINOS, George and WATSON, Charles. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2^a edition. California: Academic Press Inc., 1986.

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Recife, 29 de maio de 2002

Ofício nº 078/2002

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
À **Profa. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE

Prezada Professora,

Após o recebimento de sua carta de encaminhamento solicitando análise do procedimento com animais, em seu trabalho intitulado “Projeções retino e genículo-hipotalâmicas para o núcleo supraquiasmático de ratos mal nutridos”, os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) analisaram os aspectos relativos aos protocolos experimentais a serem adotados.

Concluimos que os procedimentos descritos para o manejo e cuidado dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

De acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais pra fins científicos, ressaltamos ainda que o sacrifício dos animais experimentais, realizado no presente trabalho, justifica-se pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico.

Diante do exposto, emitimos um parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, legível como 'Miriam Camargo Guarnieri'.

Prof.ª Miriam Camargo Guarnieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE