

# Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas

Ana Carolina Bastos Barbosa

Aumento dos níveis do substrato do receptor de insulina e da distribuição do receptor de glutamato fosforilado na serina 845 no hipocampo de ratos machos adultos programados por um modelo de malnutrição materna

> Rio de Janeiro 2017

Ana Carolina Bastos Barbosa

Aumento dos níveis do substrato do receptor de insulina e da distribuição do receptor de glutamato fosforilado na serina 845 no hipocampo de ratos machos adultos programados por um modelo de malnutrição materna

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação de Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Penha Cristina Barradas Daltro-Santos

Rio de Janeiro 2017

## CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B238 Barbosa, Ana Carolina Bastos.
Aumento dos níveis do substrato do receptor de insulina e da distribuição do receptor de glutamato fosforilado na serina 845 no hipocampo de ratos machos adultos programados por um modelo de malnutrição materna / Ana Carolina Bastos Barbosa – 2017. 88 f.
Orientadora: Penha Cristina Barradas Daltro Santos
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.
1. Desnutrição proteica – Teses. 2. Óxido nítrico sintase – Teses. 3. Desenvolvimento cognitivo – Teses. 4. Lactação - Teses. I. Santos, Penha Cristina Barradas Daltro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ana Carolina Bastos Barbosa

# Aumento dos níveis do substrato do receptor de insulina e da distribuição do receptor de glutamato fosforilado na serina 845 no hipocampo de ratos machos adultos programados por um modelo de malnutrição materna

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Apresentada em 16 de maio de 2017.

Banca

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Penha Cristina Barradas Daltro-Santos Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Examinadora:	
	Prof. Dr. Alex Christian Manhães
	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ
	Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Julia Helena Rosauro Clarke
	Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.Paula Campello Costa Lopes Universidade Federal Fluminense

> Rio de Janeiro 2017

# DEDICATÓRIA

Eu não poderia dedicar esse trabalho a outra pessoa se não você. A Frank Tenório. Espero que você veja esse trabalho de onde está. Que seja como um bom vinho.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, meu porto seguro, sem vocês eu não seria nada. É impossível listar tudo o que vocês já fizeram por mim. Esse trabalho também é de vocês: Deise, minha mãe; Paulo, meu avô; Eunice, minha avó; Eduardo, meu pai; Isabella e Fernanda, minhas irmãs do coração; Mônica, minha boadrasta. Obrigada por tudo.

Aos meus orientadores, Frank Tenório e Penha Cristina, que me adotou com muito carinho, obrigada pelos conselhos.

Aos meus amigos de laboratório, que tornaram todos os dias mais divertidos! Guedes, ainda irei pedir pela minha revanche! Luiza, vou te cobrar minha meia-calça em forma de residência na Alemanha! Marta, sempre com ajudas científicas e pessoais ("a vontade é a maior das leis")! Paulinho, obrigada pelo job! Cassiana, quando é a próxima "feixta"? Gustavo, estou ansiosa por UMUMANGA!

Aos meus ICzinhos que me ajudaram nessa jornada! Pedro, Laise, Anna e Rodrigo! Obrigada por todas as imunos, perfusões, blocos cortados... O que seria de mim sem vocês?

À nossa bioterista, Mariana, por toda a atenção e auxílio com os animais!

A todo o laboratório de Neurobiologia, cada um de vocês me ajudou de alguma forma e foram fundamentais para meu amadurecimento científico.

Aos meus amigos da vida: Amanda, Hugo, Ivan, Juliana, Thiago "Makers", Victor Barreiros, Vitor Serber, Yan. Eu sou a pessoa mais sortuda do mundo por ter amizades como as de vocês.

Às minhas amigas da faculdade: Bruna, Carol, Larissa e Rejane. Quando vamos tomar mais um café?

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Alex Christian Manhães, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Campello Costa Lopes, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julia Helena Rosauro Clarke, Dra. Viviane Younes Rapozo, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana da Cunha Faria Melibeu, por aceitarem participar desse momento.

Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância.

### **RESUMO**

BARBOSA, Ana Carolina Bastos. Aumento dos níveis do substrato do receptor de insulina e da distribuição do receptor de glutamato fosforilado na serina 845 no hipocampo de ratos machos adultos programados por um modelo de malnutrição materna. 2017. 88f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Alterações fisiológicas e metabólicas que ocorrem na vida intra-uterina ou pós-natal precoce, promovidas por um fator externo e que repercutem na vida adulta, podem ser definidas como programação metabólica. A malnutrição proteica nos estágios iniciais da vida pode causar efeitos durante o desenvolvimento e na vida adulta, como por exemplo, alterações na homeostasia da glicose, desbalanço na secreção de insulina e glicocorticoides, aumento na sensibilidade a insulina e aumento na resposta da leptina. Em um modelo de malnutrição em ratos, com administração de ração com 0% de proteína à nutriz durante os dez primeiros dias de lactação, foi demonstrado atraso na distribuição de neuropeptídeo Y (NPY) no hipotálamo e, no hipocampo, alterações no padrão de distribuição de óxido nítrico sintase (ONS) na vida adulta, além de alterações no aprendizado e memória. O objetivo desse estudo foi investigar se ratos Wistar submetidos a esse modelo de malnutrição proteica apresentam alterações nos níveis de de substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) e na distribuição da subunidade 1 do receptor de glutamato (Glur-1) fosforilado na serina 845, no hipocampo. A partir do primeiro dia de lactação, ratas nutrizes tiveram suas ninhadas ajustadas para seis machos e foram separadas em três grupos: controle (GC), malnutrido (GM) e pair-fed (GPF). A malnutrição se deu através da administração, para a mãe, de uma ração com 0% de proteína e o controle calórico foi realizado administrando 12g de ração comercial diária para a nutriz do GPF. O GC recebeu ração comercial (22% de proteína). A ingestão alimentar da nutriz e a massa corporal da prole foram aferidas. Foram quantificados os níveis IRS1 no hipocampo da prole em P10 e P60. As distribuições de pGlur-1 (Ser 845) e células NeuN positivas também foram avaliadas no hipocampo em P10 e P60. A prole GM possuía menor massa corporal em relação ao GC a partir de P4 até P60, com exceção de P30. O GPF também possui redução na massa corporal comparado com o GC. Não foram encontradas diferenças quantitativas para IRS-1, NeuN e pGlur-1 em P10. Em P60, o GM apresentou maiores níveis de IRS1 no hipocampo e maior distribuição de pGlur-1 no CA3, em relação ao grupo controle. Não foi observada alteração no número total de neurônios. Foi possível concluir que a restrição de proteínas durante a lactação afetou o desenvolvimento da massa corporal da prole, mas não causou impactos imediatos nas moléculas IRS1 e pGlur-1 no hipocampo. Os resultados observados nos níveis de IRS1 e pGlur-1 em P60 sugerem que esses animais sofreram programação metabólica, com consequências na sinalização de insulina e no aumento de seu substrato, no hipocampo, acompanhado do aumento da fosforilação do Glur-1 na serina 845. Podemos sugerir também que esses resultados corroboram estudos anteriores de nosso grupo, que observaram melhora na memória espacial e atividade exploratória nesse modelo.

# Palavras-chave: Dieta 0% Proteína. Desenvolvimento do sistema nervoso central. Programação metabólica. Memória.

## ABSTRACT

BARBOSA, Ana Carolina Bastos. *Increased insulin receptor substrate levels and distribution* of the phosphorylated glutamate receptor at serine 845 in the hippocampus of adult male rats programed in a maternal malnutrition model. 2017. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Physiological and metabolic changes that occur in intrauterine or early postnatal life, elicited by an external factor and that have repercussions in adult life can be defined as metabolic programming. Protein malnutrition in early stages of life can cause effects during development and in adult life, such as changes in glucose homeostasis, imbalance in insulin and glucocorticoid secretion, increased insulin sensitivity, and increased leptin response. In a model of malnutrition in rats, with administration of 0% protein to damns during the first 10 lactation days, we have demonstrated a delay in neuropeptide Y (NPY) distribution in the hypothalamus and in the hippocampus, alterations in the pattern of nitric oxide synthase (ONS) distribution in adult life, as also changes in learning and memory. The objective of this study was to investigate whether Wistar rats submitted to this model of protein malnutrition present alterations in insulin receptor substrate 1 (IRS1) levels and in the distribution of the phosphorylated glutamate receptor subunit 1 (Glur-1) at serine 845 in the hippocampus. From the first day of lactation, nursing rats had their litters adjusted to six males and were separated into three groups: control (GC), malnutrition (GM) and pair-fed (GPF). Malnutrition occurred through administration to the damns of a 0% protein diet and a caloric restriction group was performed by administering 12 grams of commercial chow per day to the GPF mother. The GC received commercial chow (22% protein). Food intake and body mass of offspring were measured during development. IRS1 levels were quantified in the hippocampus of offspring at P10 and P60. The distributions of pGlur-1 (Ser 845) and NeuN positive cells were also evaluated in the hippocampus in P10 and P60. The GM offspring had lower body mass in relation to the GC from P4 to P60, except for P30. GPF also has a reduction in body mass compared to controls. No quantitative differences were found for IRS-1, NeuN and pGlur-1 at P10. In P60, GM presented higher levels of IRS1 in the hippocampus and greater distribution of pGlur-1 in CA3, in relation to the control group. No change was observed in the total number of neurons. It was concluded that protein restriction during lactation affected the body mass development of the offspring, but did not cause immediate impacts on the IRS1 and pGlur-1 molecules in the hippocampus. The results observed at P60, with increased IRS1 and pGlur-1 levels suggest that these animals undergo metabolic programming, impairing insulin signaling and increasing insulin receptor substrate in the hippocampus, followed by an increase in the number of Glur-1 phosphorylated at serine 845. We can also suggest that these results corroborate previous studies of our group that observed an improvement in spatial memory and exploratory activity in this model.

Keywords: 0% Protein Diet. Central nervous system development. Metabolic programming.

Memory.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mapa Mundial da Fome	15		
Figura 2 –	Desenvolvimento do cérebro de humanos e ratos			
Figura 3 –	Esquemas representativos comparando a formação hipocampal entre			
	espécies e localização do hipocampo dentro do encéfalo de rato	23		
Figura 4 –	Esquema representativo dos tipos celulares e as camadas do			
	hipocampo do rato	24		
Figura 5 –	Vias hipocampais no rato	25		
Figura 6 –	Esquema representativo do hipocampo do rato	26		
Figura 7 –	Tráfego de receptores AMPA e plasticidade sináptica	30		
Figura 8 –	Representação esquemática do modelo experimental	38		
Figura 9 –	Posicionamento das AOIs para quantificação	43		
Figura 10 –	Ingestão acumulada das nutrizes durante até P10 da sua prole	50		
Figura 11 –	Curva de crescimento da prole durante os seus primeiros dez dias de			
	vida	51		
Figura 12 –	Níveis de IRS1 no hipocampo da prole GC, GM e GPF em P10	51		
Figura 13 –	Imunomarcação de NeuN e pGlur-1 no CA1 em ratos P10	52		
Figura 14 –	Quantificação de células positivas para NeuN, pGlur-1 e a razão entre			
	elas no CA1 em ratos P10	53		
Figura 15 –	Imunomarcação de NeuN e p-Glur-1 no CA3 em ratos P10	53		
Figura 16 –	Quantificação de células positivas para NeuN, pGlur-1 e a razão entre			
	elas no CA3 3 em ratos P10	54		
Figura 17 –	Imunomarcação de NeuN e p-Glur-1 no GD em ratos P10	55		
Figura 18 –	Quantificação de células positivas para NeuN, pGlur-1 e a razão entre			
	elas no GD em ratos P10	55		
Figura 19 –	Níveis de IRS1 no hipocampo da prole em P60	57		
Figura 20 –	Imunomarcação de NeuN e p-Glur-1 no CA1 em ratos P60	58		
Figura 21 –	Quantificação de células positivas para NeuN, pGlur-1 e a razão entre			
	elas no CA1 em ratos P60	58		
Figura 22 –	Imunomarcação de NeuN e pGlur-1 no CA3 em ratos P60	59		

Quantificação de células positivas para NeuN, pGlur-1 e a razão entre		
elas no CA3 em ratos P60	60	
Imunomarcação de NeuN e p-Glur-1 (Ser 845) no GD em ratos P60	61	
Quantificação de células positivas para NeuN, pGlur-1 e a razão entre		
elas no GD em ratos P60	62	
	Quantificação de células positivas para NeuN, pGlur-1 e a razão entre elas no CA3 em ratos P60 Imunomarcação de NeuN e p-Glur-1 (Ser 845) no GD em ratos P60 Quantificação de células positivas para NeuN, pGlur-1 e a razão entre elas no GD em ratos P60	

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Efeitos da malnutrição no desenvolvimento do SNC do rato	20
Tabela 2 –	Composição das rações comercial e manipulada	38
Tabela 3 –	Composição e modo de preparo da ração artesanal utilizada	40
Tabela 4 –	Massa corporal das nutrizes	48
Tabela 5 -	Ingestão alimentar da nutriz	49
Tabela 6 –	Massa corporal da prole ao longo do desenvolvimento	56

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-MSH	Hormônio alfa estimulante de melanócito				
AgRP	Proteína relacionada ao gene agouti				
Akt/PKB	Proteína quinase B				
alv	Alveus				
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metilisoxazol-4-propiônico				
AMPAr	Receptores AMPA				
AOI	Área de interesse				
BSA	Albumina de soro bovino				
CA	Corno de Ammon				
CA1	Corno de Ammon 1				
CA2	Corno de Ammon 2				
CA3	Corno de Ammon 3				
CG	Camada granular do giro denteado				
СМ	Camada molecular do giro denteado				
СР	Camada polimórfica				
DAB	Tetra-hidrocloreto de 3.3'-diaminobenzidina				
EC	Córtex entorrinal				
FC	Fator de cálculo				
GD	Giro denteado				
GABA	Ácido gama-aminobutírico				
GC	Grupo controle				
GluN2A	Receptor 2A NMDA				
GluN2B	Receptor 2B NMDA				
Glur-1	Subunidade 1 de receptor AMPA				
GM	Grupo malnutrido				
GPF	Grupo pair-fed				
hf	Fissura hipocampal				
IR	Receptor de insulina				
IRS	Substrato do receptor de insulina				
IRS1	Substrato 1 do receptor de insulina				

IRS2	Substrato 2 do receptor de insulina
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potencial de longa-duração
MAP quinase	Proteína-quinase ativada por mitógenos
MBP	Proteína básica de mielina
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NMDA	N-metil D-aspartato
NMDAr	Receptores NMDA
NPY	Neuropeptídeo Y
OCT	Optimal Cutting Temperature
ONS	Óxido nítrico sintase
Р	Dia pós-natal
PBS	Tampão Fosfato Salina
pGLur-1	Glur-1 fosforilado
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
POMC	Proopiomelanocortina
S831	Serina 831
S845	Serina 845
Ser	Serina
SLM	Stratum lacunosum-moleculare
SNC	Sistema nervoso central
SO	Stratum Oriens
SP	Stratum pyramidale
T-TBS	Tampão Tris Tween Salina

# SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO			
1	REVISÃO DA LITERATURA			
1.1	Desenvolvimento do sistema nervoso central e o impacto da			
	malnutrição			
1.2	Hipocampo			
1.2.1	Anatomia			
1.2.2	Aprendizado e Memória			
1.3	Insulina no SNC			
1.4	Justificativa			
2	OBJETIVOS			
2.1	Objetivo geral			
2.2	Objetivos específicos			
3	METODOLOGIA			
3.1	Animais			
3.2	Instalação da malnutrição			
3.3	Avaliação da ingestão alimentar e massa corporal			
3.4	Perfusão			
3.5	Criossecção			
3.6	Imunohistoquímica			
3.7	Quantificação de células			
3.8	Coleta de Amostra para Western Blot			
3.9	Análise de Proteínas			
3.10	Eletroforese e Western Blot			
3.11	Quantificação das bandas de Western Blot			
3.12	Análise estatística			
4	RESULTADOS			
4.1	Efeitos na nutriz			
4.1.1	Massa corporal da nutriz			
4.1.2	Ingestão Alimentar			
4.2	Efeitos na prole em P10			

4.2.1	Evolução da massa corporal da prole		
4.2.2	<u>Níveis de IRS1 no hipocampo</u>	51	
4.2.3	Imunomarcação de NeuN e pGlur-1 (Ser 845) no hipocampo	52	
4.2.3.1	Corno de Ammon 1	52	
4.2.3.2	Corno de Ammon 3	53	
4.2.3.3	Giro Denteado	54	
4.3	Efeitos na prole em P60	56	
4.3.1	Evolução da massa corporal da prole	56	
4.3.2	Níveis de IRS1 no hipocampo	56	
4.3.3	Distribuição de pGlur-1 (Ser 845) no hipocampo	57	
4.3.3.1	Corno de Ammon 1	57	
4.3.3.2	Corno de Ammon 3	59	
4.3.3.3	Giro Denteado	60	
5	DISCUSSÃO	63	
	CONCLUSÕES	69	
	REFERÊNCIAS	70	

## **INTRODUÇÃO**

Nos países em desenvolvimento e, sobretudo, nos países subdesenvolvidos, a malnutrição é um dos maiores problemas de saúde (Figura 1). Nestes países, milhões de pessoas vivem abaixo da linha da pobreza e suas dietas são inadequadas calórica e nutricionalmente, com níveis de proteínas alarmantemente baixos (RANADE e cols., 2008). Estima-se que cerca de 30% das mulheres de baixa renda já tiveram que cortar ou pular uma refeição, comer menos que o recomendado ou passar fome devido a dificuldades financeiras (BRAVEMAN e cols., 2010).

O termo malnutrição se refere à deficiência tanto de micro quanto de macronutrientes essenciais para a manutenção do organismo, estando estes em proporções abaixo do ideal ou ausentes na dieta. É comum que o termo seja confundido com desnutrição, que se relaciona ao consumo calórico insuficiente, onde há uma falta generalizada de nutrientes, como proteínas, carboidratos, lipídeos e minerais (DE SOUZA e cols., 2011).

Figura 1 – Mapa Mundial da Fome



Legenda: Mapa Mundial da Fome mostrando a incidência de desnutrição crônica no mundo (The FAO Hunger Map, 2015).

Fonte: ww.fao.org

A carência de nutrientes durante a infância está intimamente relacionada com o aumento da incidência de doenças infecciosas, retardo no desenvolvimento psicomotor, baixo rendimento escolar e baixa capacitação na vida adulta (SOUZA e cols., 2011). Crianças que passaram por um período severo de privação nutricional durante o início da vida pós-natal podem exibir desordens neurológicas e vários graus de retardo mental, que podem persistir por anos após a recuperação nutricional (CRAVIOTO e ARRIETA, 1982). Embora a prevalência da malnutrição tenha reduzido no mundo, nas nações subdesenvolvidas cerca de 50% das mortes de crianças menores de 5 anos é influenciada por algum estado de malnutrição (FLORIAN e NUNES, 2010).

Todos os nutrientes desempenham um papel fundamental no desenvolvimento adequado do sistema nervoso. Entretanto, certos nutrientes se destacam perante outros durante o período fetal e neonatal. Dentre estes nutrientes, é possível apontar: proteínas, zinco, selênio, folato, iodo, ferro, vitamina A, colina e ácidos graxos de cadeias longas poliinsaturados (GEORGIEFF, 2007).

A proteína proveniente da dieta consiste em aminoácidos essenciais e não-essenciais necessários para a síntese proteica ou obtenção de energia, através da gliconeogênese. Para manter o equilíbrio, caso a ingestão energética de um organismo não seja satisfatória, a ingestão proteica deve ser aumentada, já que os aminoácidos seriam direcionados para a síntese e oxidação da glicose.

Além dos efeitos imediatos da malnutrição durante o desenvolvimento, é bem documentado que alguns de seus efeitos podem permanecer latentes por muitos anos, manifestando-se apenas durante a vida adulta ou senil, onde há maiores riscos de aumento da produção da proteína beta-amilóide, que pode induzir a doença de Alzheimer, além de desenvolver doenças coronarianas e obesidade (MALONEY e cols., 2012). Alterações tardias causadas pela malnutrição foram inicialmente observadas em indivíduos cujas mães estavam grávidas durante o "Inverno da Fome", na Holanda (ROSEBOOM e cols., 2000).

É definido como programação metabólica alterações fisiológicas e metabólicas promovidas no útero ou na vida pós-natal precoce estimuladas por um fator externo – como a nutrição – que repercutem na vida adulta (DAHRI e cols., 1991). Embora a programação metabólica esteja relacionada a efeitos tardios, várias dessas alterações já se manifestam ao nascimento ou desmame (DES ROBERT e cols., 2009). Esse fenômeno tem sido chamado, mais recentemente de plasticidade ontogenética, devido a sua característica mais probabilística do que determinística (GLUCKMAN e HANSON, 2004).

Hales e Barker (2001) formularam a hipótese do fenótipo poupador. Eles sugerem que em casos de nutrição materna deficientes ou níveis reduzidos de nutrientes ao feto, ocorre uma resposta adaptativa que privilegiaria o desenvolvimento de órgãos chave, como o cérebro, às custas de outros tecidos, como músculo, fígado e pâncreas endócrino. Gluckman e Hanson (2004) sugerem que ocorrem respostas adaptativas, ou seja, o indivíduo sofre adaptações no útero e/ou durante o desenvolvimento pós-natal em virtude do ambiente ao qual ele foi exposto. Quando essa reposta adaptativa é apropriada, o fenótipo é normal. No entanto, quando não ocorre esta adaptação, podem ocorrer diversas manifestações, como a síndrome metabólica.

A malnutrição proteica durante o início da vida também programa o metabolismo para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 durante a vida adulta (DE OLIVEIRA e cols., 2013). Hales e Berker (1992) propuseram que a malnutrição durante a vida intra-uterina e perinatal resulta no comprometimento das células  $\beta$ -pancreáticas, levando a deficiência de insulina na vida adulta. Em ratos submetidos a um modelo de malnutrição proteica por quatro semanas imediatamente após o desmame, foi observado tanto a redução da secreção de insulina (CARNEIRO e cols., 1995) quanto aumento da sensibilidade à insulina, representado por maiores níveis de substrato 1 do receptor de insulina (IRS1), dentre outros marcadores (REIS e cols., 1997).

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Desenvolvimento do sistema nervoso central e o impacto da malnutrição

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) ocorre em fases que diferem de acordo com as diversas porções do encéfalo e suas regiões, variando em tempo e de uma espécie para outra. A Figura 2 mostra uma comparação entre a cronologia do desenvolvimento do SNC em ratos e humanos.





Legenda: Esquema representativo comparando as diferenças cronológicas em etapas do desenvolvimento neurológico pré e pós-natal, além da curva de crescimento cerebral. Fonte: Adaptado de Morgane e cols., 2002.

A organogênese ocorre, em ratos, durante o período embrionário. No período fetal, por sua vez, ocorrem a histogênese macroneural, início da gliogênese, migração celular e início da diferenciação celular. No início da vida pós-natal, durante o nascimento e no período de amamentação, ainda ocorrem histogênese microneural, gliogênese tardia, migração e diferenciação microneural e oligodendroglial, mielinização e sinaptogênese. Alguns eventos continuam até a maturidade, como a histogênese microneural, diferenciação celular, sinaptogênese e mielinização (MORGANE e cols., 1993; SEMPLE e cols., 2013).

Em roedores, o período crítico da sinaptogênese ocorre durante as primeiras três semanas pós-natal, com pico na segunda semana (CRAIN e cols., 1973). A densidade sináptica em ratos e camundongos é baixa na primeira semana pós-natal, com aumento abrupto a partir do décimo dia pós-natal, atingindo nível equivalente ao animal adulto aos trinta dias (DE FELIPE e cols., 1997; MICHEVA e BEAULINEU, 1996; RICE e BARONE, 2000).

Morgane e colaboradores (2002) afirmam que a nutrição inadequada é um dos principais fatores não-genéticos que afetam o desenvolvimento do cérebro. É essencial que a oferta de nutrientes esteja adequada para a manutenção do crescimento e desenvolvimento normal de todas as funções fisiológicas. Estudos demonstram que a deficiência em diversos micro e macronutrientes, como triptofano (PENEDO e cols., 2009; GONZALÉZ e cols., 2008), ômega-3 (DE VELASCO e cols., 2012), ácidos graxos essenciais (PASSOS e cols., 2012), vitamina D (SCHOENROCK e TARANTINO, 2016; HAWES e cols., 2016), ferro (YADAV e CHANDRA, 2011; GEORGIEFF, 2007), entre outros, afetam o desenvolvimento do sistema nervoso central.

Diversos trabalhos já demonstraram a importância das proteínas como componentes críticos para o bom desenvolvimento do cérebro, uma vez que estas são fontes de aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas estruturais, enzimas, neuropeptídios e neurotransmissores (VALADARES e cols., 1999). A malnutrição proteica e proteico-calórica nos estágios iniciais da vida é capaz de acarretar prejuízos no desenvolvimento encefálico e de alterar a morfologia, a neuroquímica e a neurofisiologia (BEDI, 1991; LUKOYANOV e ANDRADE, 2000; MORGANE e cols., 2002, ROTTA e cols., 2003; ALAMY e cols., 2005; HERNANDES e ALMEIDA, 2003; AMARAL e cols., 2015).

Diversos modelos experimentais podem ser utilizados para promover a malnutrição proteica. Dentre eles estão: administração de dieta hipoproteica; redução da quantidade de alimento disponível; organização de um grande número de filhotes por nutriz; e separação de filhotes e lactante. Todas essas técnicas produzem efeitos significativos no desenvolvimento físico e comportamental de ratos, como foi demonstrado por Hernandes e Almeida (2003).

Em humanos, o período entre a 24<sup>a</sup> e 42<sup>a</sup> semana de gestação representa a janela temporal onde o cérebro em desenvolvimento é particularmente mais susceptível aos insultos provocados pela privação nutricional dada a rápida trajetória dos diversos processos de maturação neurológica que ocorrem nesta época, de acordo com Georgieff (2007). O período de lactação em ratos equivale ao terceiro trimestre de gestação em humanos, logo, uma injúria nutricional imposta neste período pode acarretar alterações permanentes no SNC (Tabela 1).

Período de Malnutrição	Período embrionário (organogênese)	Períofo fetal (histogênese neural)	Período da amamentação	Período pós- desmame até maturidade	Adulto (período da microneurogên ese tardia e mielinização)
Efeitos da malnutrição grave sobre o SNC	Malformações cerebrais	Alterações na gênese de neurônios e glia radial, distúrbios da migração neuronal	Alteração da gênese dos microneurônos , diferenciação celular, sinaptogênese, gliogênese tardia e mielinização	Alteração da gênese dos microneurôn ios, diferenciaçã o celular, sinaptogênes e e mielinização	Efeitos essencialmente não permanentes

Tabela 1 - Efeitos da malnutrição no desenvolvimento do SNC do rato

Fonte: Adaptado de Morgane e cols., 1993.

Diversos estudos vêm avaliando os efeitos adversos atribuídos ao insulto nutricional. Ribeiro (1997), por exemplo, demonstrou que a malnutrição proteica, somente durante o período de lactação, é capaz de promover alterações no peso corporal e no padrão de ingestão alimentar, que são mantidos na vida adulta do animal. Esse tipo de perturbação proteicoenergético em fetos e neonatos reduz o conteúdo de DNA e RNA neural, além de alterar o perfil de ácidos graxos (WINICK e NOBLE, 1966; WINICK e ROSSO, 1969; BERARDINO e cols., 2017). Também há redução no número de neurônios e no grau de mielinização e síntese proteica, sendo esta última causadora de alterações nas proteínas estruturais, concentração de fatores de crescimento, produção de neurotransmissores e redução do tamanho do encéfalo. É importante ressaltar que essas mudanças também incluem a redução no número de sinapses e alterações na arborização dendrítica (BASS e cols., 1970; JONES e DYSON, 1981; WIGGINS e cols., 1984; NISHIJIMA, 1986; YAMAMOTO e cols., 1987; BENITEZ-BRIBIESCA e cols., 1999). Cognição e comportamento depressivo e ansioso também estão relacionados a essa deficiência perinatal (NAIK e cols., 2015; BELLUSCIO e cols., 2014). Estudos tem demonstrado que quanto mais prematuro é o insulto nutricional, mais severo e duradouro são os seus efeitos (MORGANE e cols., 1992)

Em um estudo conduzido por Montanha-Rojas e colaboradores (2005) em nosso laboratório, foi demonstrado que a malnutrição proteica com 0% de proteína à nutriz durante os 10 primeiros dias de lactação acarreta em alterações na expressão da proteína básica de mielina (MBP) no cerebelo de ratos. Marcelino e colaboradores (2004) também verificaram, em nosso laboratório, atraso na expressão da óxido nítrico sintase (ONS) em ratos expostos a esse mesmo modelo. Uma vez que as alterações encontradas foram observadas até a idade adulta, foi reforçada a hipótese de que a malnutrição proteica, mesmo restrita ao período de lactação, é capaz de promover mudanças plásticas que perduram na vida adulta do animal. Utilizando o mesmo modelo, nosso laboratório produziu outro estudo que demonstrou que animais malnutridos sofrem alterações nos níveis de acúmulo de glicogênio em tanicitos encontrados em determinados núcleos hipotalâmicos (LIMA e cols., 2010) e Rocha e colaboradores (2014) observaram atraso na expressão de neuropeptídio Y (NPY) na região. Logo, estes resultados reforçaram a hipótese de que o estado nutricional materno durante a lactação é crítico para o desenvolvimento cerebral da progênie.

Uma das regiões afetadas pela malnutrição nos estágios iniciais da vida é o hipocampo, onde já foi demonstrado número reduzido de neurônios, sinapses e arborização dendrítica (DIÁS-CINTRA e cols., 1991; BEDI, 1991). Alterações cognitvas são controversas, uma vez que alguns autores reportaram prejuízo no desempenho de animais malnutridos em testes de aprendizado e memória espacial (FUKUDA e cols., 2002; FUKUDA e cols., 2007; VALADARES e cols., 2005; CASTRO e cols., 1989, CORDOBA e cols., 1994; TONKISS e cols., 1990), e outros não encontraram diferenças (TONKISS e GALLER, 1990; WOLF e cols., 1986; CAMPBELL e BEDI, 1989; BEDI, 1992). Essas diferenças nos resultados se devem principalmente aos diferentes modelos implementados nos estudos.

De fato, em nosso laboratório e utilizando o mesmo modelo de malnutrição deste trabalho, Lotufo (2012) observou no hipocampo alterações no padrão de distribuição da ONS através da histoquímica de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) - diaforase, em 10 e 20 dias pós-natal, e alterações comportamentais em animais malnutridos adultos (90 dias pós-natal), uma vez que eles apresentaram melhora significativa da memória

e aprendizado e aumento da atividade exploratória. Barbosa (2014) verificou atraso na proliferação celular no hipocampo desses animais, além de alteração no desenvolvimento das células gliais, como astrócitos imaturos e células da glia radial, através da imunomarcação de vimentina, que estava alterada no grupo malnutrido, não apresentando o mesmo padrão que o grupo controle de redução de marcação ao longo do desenvolvimento. Guedes (2015) também verificou redução na subpopulação de neurônios neuropeptidérgicos, no hipocampo, com 5 dias pós-natal, sem alteração na população de neurônios, o que pode acarretar em alterações na modulação da circuitaria hipocampal em um período crítico do desenvolvimento.

## 1.2 Hipocampo

#### 1.2.1 Anatomia

Localizado na porção medial do lobo temporal, o hipocampo é uma estrutura cerebral essencial do sistema límbico, assim como a amígdala (ao qual está intimamente ligado), o núcleo accumbens, o hipotálamo, o tálamo, a área tegmental, o giro cingulado e o septo. O complexo hipocampal é um grupo de regiões cerebrais que compreende as regiões do giro denteado (GD), o hipocampo propriamente dito, o Corno de Ammon (CA) - composto por três subdivisões: CA3, CA2 e CA1 -, subículo, pré-subículo, para-subículo e córtex entorrinal. As fronteiras entre as regiões da formação hipocampal ainda não estão firmemente estabelecidas, logo, neste trabalho utilizaremos o termo hipocampo para designar a combinação do giro denteado e Corno de Ammon, uma vez que este critério é o mais utilizado na literatura. O maior tamanho das células piramidais do CA3 e CA2, comparadas às do CA1, e os tipos de vias aferentes e eferentes diferenciados destas áreas, torna clara a separação dessas regiões. A região CA2 possui existência controversa e se caracteriza por uma estreita zona de células entre o CA3 e CA1, com células piramidais semelhantes às da do CA3, contudo, não é enervado pelas fibras musgosas do giro denteado, assim como o CA1 (PISKOROWSKI e CHEVALEYRE, 2012). Os hipocampos dos ratos, macacos e humanos possuem semelhanças, como as camadas celulares básicas e as vias aferentes e eferentes, as quais comunicam as regiões hipocampais (Figura 3). Porém, apesar dessas similaridades entre o cérebro de roedores e primatas, é importante ressaltar que o hipocampo primata não é uma versão aumentada do hipocampo de um roedor, uma vez que essa região em macacos e humanos apresentam maior complexidade e proporções diferentes. O estudo da biologia comparativa permite realizar inferências sobre a relação de um determinado resultado entre diversas espécies de alto grau de semelhanças, entretanto, é importante ter cautela, uma vez que ainda assim há diferenças entre espécies (ANDERSEN e cols., 2007).

Figura 3 – Esquemas representativos comparando a formação hipocampal entre espécies e localização do hipocampo dentro do encéfalo de rato



Legenda: A – Cortes coronais do hipocampo de rato, macaco e humano corados com coloração de Nissl; B – Esquema simplificado das regiões e principais vias de comunicação hipocampais de um rato. Fonte: Adaptado de Andersen e cols., 2007.

A principal camada de células neurais do CA é composta por neurônios piramidais excitatórios, presentes por toda essa região e apresentando diferentes morfologias (TOLE e cols., 1997). Cerca de 90% do hipocampo é composto por células piramidais glutamatérgicas e células granulares do GD (Figura 4), enquanto o restante das células representa basicamente a porção de interneurônios inibitórios. Esses interneurônios são capazes de inibir outros através da liberação da ácido gama-aminobutírico (GABA) (FRITSCHY e cols., 1998). O

GD, estrutura hipocampal trilaminar composta pelo estrato molecular (mais externo), estrato polimórfico (mais interno) e estrato granular, composto por células granulares densamente agrupadas. Essas células formam um sistema de fibras musgosas com seus axônios, que se conectam ao CA (AFIFI e BERGMAN, 2008). A camada polimófica também possui interneurônios.



Figura 4 – Esquema representativo dos tipos celulares e as camadas do hipocampo do rato

Legenda: Em A, exemplo de células piramidais na região CA1 e CA3 e dos *strata* que formam o corno de Ammon. Em B, células granulares, células em cesto no giro denteado e as camadas do giro denteado. Fonte: Adaptado de O'Keefe e Nadel, 1978.

Há três grandes vias aferentes no complexo hipocampal: a via perfurante, que tem origem no córtex entorrinal e faz conexões excitatórias com as células granulares do GD; a via das fibras musgosas, formada por axônios neuronais da camada granular do GD que se conectam com neurônios piramidais da região CA3; e a via dos colaterais de Schaffer, constituída pelos axônios neuronais piramidais da CA3, que se projetam para as células piramidais da região CA1 (Figura 5) (TONI e SCHINDER, 2015.).

Figura 5 – Vias hipocampais no rato



Legenda: Esquema representando o corte transversal do hipocampo, demonstrando o GD, CA3 e CA1. A principal via de entrada neste circuito é pela via perfurante, composta de axônios originados do córtex entorrinal (EC) lateral e medial, que se conectam pela camada molecular. Neurônios da camada granular do GD projetam fibras musgosas para os neurônios piramidais do CA3, que então projetam os colaterais de Schaffer para os neurônios piramidais da região CA1, que fazem sinapses com os dendritos de outras células piramidais, cujos axônios projetam para fora do hipocampo. Outras entradas para os neurônios granulares incluem interneurônios, localizados na camada molecular e no hilo, compostos principalmente por células musgosas e em cesto.

Fonte: Adaptado de Toni e Schinder, 2015.

As transmissões aferentes que chegam à formação hipocampal são provenientes do córtex entorrinal. Um dos destinos dos axônios das células das camadas mais superficiais do córtex entorrinal segue em direção ao giro denteado. Estas projeções do córtex entorrinal para o giro denteado formam umas das maiores vias aferentes hipocampais e é chamada de via perfurante. Apesar de o córtex entorrinal ser a maior fonte de informações aferentes do giro denteado, este último não manda projeções para o córtex, tornando esta via unidirecional (O'KEEFE e NADEL, 1978).

As células granulares são as mais importantes do GD, e estas projetam axônios para a região CA3 do hipocampo através de fibras musgosas. No entanto, as células do CA3 não projetam axônios para o giro denteado. As células piramidais do CA3 são a maior fonte de estímulos aferentes para região CA1, caracterizando a via colateral de Schaffer. Como as outras vias, esta também é unidirecional (DANGLOT e cols., 2006).

Uma vez que estes impulsos aferentes chegam a CA1, o padrão de conexões se torna mais elaborado. O CA1 projeta seus prolongamentos para o subículo e córtex entorrinal. Sendo assim, através destas conexões, é fechado o circuito hipocampal, o qual começa nas camadas mais superficiais do córtex entorrinal e termina nas camadas mais profundas desta região, para assim, se conectar com o resto do cérebro (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004).

O CA é uma estrutura em forma de C que possui sete strata conhecidos: stratum alveus; stratum oriens; stratum pyramidale; stratum lucidium; stratum radiatum; stratum lacunosum e stratum moleculare, sendo o alveus o mais externo e o moleculare mais interno. O stratumalveus é constituído de fibras aferentes e eferentes que originam a fímbria/fórnix, uma das principais eferências do hipocampo, e contém axônios provenientes das células piramidais do stratum pyramidale. Na região CA3, esse estrato recebe os contatos sinápticos das fibras musgosas, que cursam pelo stratum lucidium. Também estão presentes nessa região, os corpos de neurônios inibitórios como as células em cesto, os neurônios biestratificados e os neurônios trilaminares radiais. O stratum lucidium, um dos estratos mais finos do hipocampo, possui fibras musgosas, que cursam por ele, provindas de células granulares do DG até a região CA3. O stratum radiatum contém fibras comissurais e septais, e fibras colaterais de Schaffer que são projetadas para as regiões CA1 e CA3. Interneurônios como as células em cesto, as bioestratificadas e as radiais trilaminares podem ser encontradas dispostas superficialmente nesta camada. O stratum lacunosum, composto pelas ramificações dos dendritos apicais das células piramidais, fibras de Schaffer e fibras da via perfurante das camadas do córtex entorrinal, é agrupado com o stratum moleculare, de forma a ser denominado de stratum lacunosum-moleculare. Na camada mais profunda, stratum *moleculare*, a via de fibras perfurantes forma sinapses com os dendritos apicais e distais das células piramidais (Figura 6) (PAXINOS e WATSON, 1998).



Figura 6 – Esquema representativo do hipocampo do rato

Legenda: Em A, os diferentes strata que formam o hipocampo, alv – alveus, SO – *stratum oriens*, SP – *stratum pyramidale*, SLM – *stratum lacunosum-moleculare*, CM – camada molecular do giro denteado, CG – camada granular do giro denteado, hf – fissura hipocampal. Em B, as regiões do hipocampo, DG – giro denteado, CP – camada polimórfica do giro denteado, CA1, CA2 e CA3 – corno de Ammon 1, 2 e 3.

Fonte: Adaptado de Paxinos e Watson (1998).

## 1.2.2 Aprendizado e Memória

O hipocampo é uma das poucas regiões do encéfalo adulto, como a zona subventricular (em roedores) e do estriado (em humanos), a produzir novos neurônios (ERNST e cols., 2014). A geração de novos neurônios e da glia no hipocampo adulto tem sido relacionada com algum dos mecanismos do processo de aprendizado e a memória. Eles são adicionados na camada granular do giro denteado durante a vida e sua quantidade está relacionada com experiências, aprendizados e exercícios (DENG e cols., 2010; BIEDERMANN e cols., 2016), sendo uma forma de plasticidade hipocampal. Entretanto, há uma diminuição substancial na neurogênese durante a vida e senescência (SEKI e ARAI, 1995; KUHN e cols., 1996; TROPEPE e cols., 1997; KEMPERMANN e cols., 1998; KEMPERMANN e cols., 2002). Isso foi observado em roedores a partir da taxa de proliferação celular, número total de células progenitoras e numero reduzido de neuroblastos e neurônios imaturos. Isso corrobora com a possibilidade de que menor neurogênese compromete com a função hipocampal e colabora, pelo menos em parte, com a redução no aprendizado e memória e deterioração cognitiva em idosos. E, embora a densidade de contatos sinápticos nas células granulares do GD reduza com a idade (GEINISMAN e cols., 1992; FLOOD e cols., 1993), a complexidade dendrítica e a densidade de células granulares e neurônios piramidais do CA3 e CA1 não se modifica com a senescência (GEINISMAN e cols., 1992).

Kandel (2000) afirma que o hipocampo é responsável pela consolidação e formação da memória recente. O armazenamento da memória de longo prazo, por sua vez, seria uma função do córtex cerebral. É estabelecido que as mudanças duradouras nas sinapses é a base celular do aprendizado e da memória (ALKON e NELSON, 1990; ECCLES, 1964; HEBB, 1949; KANDEL, 1997).

Os mecanismos moleculares envolvendo a formação da memória começaram a ser compreendidos após a descoberta do potencial de longa duração (LTP), que é uma forma de

plasticidade sináptica dependente de experiências e acredita-se que seja o maior mecanismo celular relacionado ao aprendizado e memória (GOVINDARAJAN e cols., 2011; NABAVI e cols., 2014).

Os processos de potencial de longa duração e depressão de longa duração (LTD) são os maiores exemplos de plasticidade sináptica. Uma característica marcante do LTP e LTD é que um curto período de atividade sináptica pode desencadear em alterações persistentes na transmissão sináptica, que pode durar horas ou dias. Em geral, pode-se dizer que a estimulação de alta frequência potencializa a atividade sináptica, levando ao LTP, enquanto estímulos por frequências menores deprime a atividade sináptica, levando ao LTD. A plasticidade sináptica pode se caracterizar pela mudança no número, localização e propriedades dos receptores pós-sinápticos envolvidos nesses processos. (DURAND e cols., 1996; ISAAC e cols., 1995; LIAO e cols., 1995).

Ambos são induzidos pela ativação pós-sináptica de receptores N-metil D-aspartato (NMDA) e por modificações no número de receptores pós-sinápticos ácido alfa-amino-3hidróxi-5-metilisoxazol-4-propriônico (AMPA) (MORRIS e cols., 1986; DUDEK e BEAR, 1992). NMDAr (receptores NMDA) são canais de cátions não-específicos, com alta permeabilidade a Ca<sup>2+</sup>. Na membrana em repouso, o canal fica bloqueado por íons Mg<sup>2+</sup> e é desbloqueado pela estimulação repetitiva ou de alta amplitude, provocando uma despolarização capaz de remover o bloqueio dos canais NMDA pelo Mg<sup>2+</sup> (IZQUIERDO, 2011). Quando ativados há entrada de íons Ca<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup> e, quando a concentração intracelular dos íons de cálcio alcança o limite, vias de transdução de sinal são iniciadas levando a alterações na resposta sináptica. Quando as sinapses não demonstram resposta nos AMPAr (receptores AMPA), elas são consideradas pós-sinapticamente silenciosas.

Os AMPAr são receptores transmembrana ionotrópicos de glutamato, assim como os receptores kainato e NMDA (DINGLEDINE e cols., 1999) e medeiam transmissões sinápticas aceleradas no sistema nervoso central e contribuem para a plasticidade sináptica (PALMER e cols., 2005). Os AMPAr são formados por quatro subunidades homólogas: Glur-1, Glur-2, Glur-3 e Glur-4. Elas promovem a maioria das neurotransmissões excitatórias do SNC (TRAYNELIS e cols., 2010) e em condições basais, os complexos Glur-1/Glur-2 e Glur-2/Glur-3 medeiam cerca de 80 e 20%, respectivamente, das respostas pós-sinápticas no hipocampo de camundongos não-manipulados (LU e cols., 2009). O hipocampo imaturo, assim como outras regiões do encéfalo, expressa Glur-4/Glur-2 (Zhu e cols., 2000) e a expressão da subunidade 4 no hipocampo decai para níveis quase indetectáveis no décimo dia pós-natal (HOLLMAN e HEINEMANN, 1996; WISDEN e SEEBURG, 1993). Embora essas

subunidades sejam homólogas, as propriedades funcionais e o tráfego dos AMPAr dependem da composição de suas subunidades (DINGLEDINE e cols., 1999; COLLINGRIDGE e cols., 2004; MALINOW e MALENGA, 2002). A impermeabilidade ao Ca<sup>2+</sup> ocorre graças à subunidade Glur-2.

Estudos demonstram que uma fração razoável de sinapses no CA1 do hipocampo não apresenta de AMPAr, enquanto a maioria delas possui receptores NMDA (NMDAr) (NUSSER e cols., 1998; PETRALIA e cols., 1999; TAKUMI e cols., 1999). A fração de sinapses com ausência de AMPAr normalmente é maior durante o desenvolvimento, o que é consistente com as observações de que, em ratos com idades mais novas, as sinapses silenciosas são mais prevalentes (DURAND e cols., 1996; ISAAC e cols., 1997; LIAO e MALINOW, 1996; RUMPEL e cols., 1998; WU e cols., 1996).

Em condições fisiológicas, o glutamato é liberado dos neurônios pré-sinápticos e ativa receptores ionotrópicos pós-sinápticos, o que leva a um aumento no influxo dos íons Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> (MARK e cols., 2001). As concentrações de glutamato na fenda sináptica são reguladas pela combinação de dois processos: liberação e recaptação de glutamato (KANAI e HEDIGER, 2003). A recaptação, ou *clearance*, é realizado principalmente pelos astrócitos (DANBOLT, 2001), que ao recapturar o excesso de glutamato, o converte em glutamina pela glutamina sintetase. A glutamina, então, é liberada no espaço extracelular e captada por neurônios pré-sinápticos que irão reconverter a molécula em glutamato (DANBOLT, 2001; NEWCOMB e cols., 1997).

Alterações na força das transmissões sinápticas excitatórias glutamatérgicas estão associadas com o aprendizado e adaptação ao nosso ambiente (BLISS e LOMO, 1973; BLISS e COLLINGRIDE, 1993; MALINOW e MALENKA, 2002; VITUREIRA e GODA, 2013). Essas mudanças na força sináptica podem ser atingidas pela alteração da densidade dos receptores AMPA na membrana pós-sináptica (LÜSCHER e cols., 1999; SHI e cols., 2001), sendo a exocitose de AMPAr essencial para a indução da LTP (LÜSCHER e cols., 1999). Além disso, acredita-se que esses receptores possuem função em certas formas de aprendizado e memória (BLISS e COLLINGRIDGE, 1993; LINDEN, 1994), no desenvolvimento de sensibilização de estimulantes psicomotores (WOLF, 1998) e em diversas formas de doenças neurodegenerativas (LIPTON e ROSENBERG, 1994). A geração de LTD no hipocampo *in vivo*, por sua vez, causa diminuição no número de AMPAr nos sinaptoneurossomos – vesículas ou terminais isolados que se separaram do axônio terminal – evidenciando a endocitose do receptor (HEYNEM e cols., 2000) (Figura 7).

#### Figura 7 – Tráfego de receptores AMPA e plasticidade sináptica



Legenda: Tráfego de receptores AMPA e plasticidade sináptica. Alterações na função sináptica podem induzir a ativação de NMDAr, que altera a força das sinapses através da regulação do número de AMPAr. A ativação de NMDAr leva ao influxo de cálcio pelo receptor que pode inciar a LTP ou LTD. Aumento de força sináptica durante a LTP ocorre através do aumento do número de receptores AMPA pós-sinápticos, que pode ser mediado tanto pela exocitose dos AMPAr quanto pela sua difusão lateral. A LTD leva a a endocitose desses receptores e os afasta por difusão.

Fonte: Adaptado de Henley e Wilkinson, 2013.

A fosforilação da serina (Ser) do Glur-1 (Subunidade 1 de AMPAr) nos resíduos serina 831 (S831) e serina 845 (S845) regula o funcionamento dos receptores AMPA através de dois mecanismos: modulação das propriedades dos canais iônicos e regulação do arranjo pós-sináptico do receptor (BENKE e cols., 1998; HAYASHI e cols., 2000; SHI e cols., 1999 e 2001). Esses eventos de fosforilação são interessantes porque podem ocorrer em um curto espaço de tempo e potencializam a função do canal iônico do receptor (BARRIA e cols., 1997; DERKACH e cols., 1999; BANKE e cols., 2000). Mais especificamente, a fosforilação na S845 aumenta a permeabilidade do canal iônico (BANKE e cols., 2000) e a duração de abertura do canal (GREENGARD e cols., 1991; HAN e WHELAN, 2009), e a fosforilação no S831 aumenta sua condutibilidade (DERKACH e cols., 1999).

Existem diversas outras moléculas e neurotransmissores que estão relacionadas com o aprendizado e a memória, embora uma compreensão completa desse mecanismo ainda não tenha sido elucidada, já que não se conhece ainda todos os mecanismos moleculares que ocorrem nas sinapses e nem como eles se relacionam (PONTES e SOUSA, 2016). Alguns exemplos de moléculas envolvidas na modulação desse sistema são o óxido nítrico (PIGOTT e GARTHWAITE, 2016), GABA (DEIDDA e cols., 2015), grelina (GHERSI e cols., 2015), somatostatina (VIOLLET e cols., 2008), insulina (BANKS e cols., 2012), entre outros.

## 1.3 Insulina no SNC

A insulina é um hormônio peptidérgico composto por 51 aminoácidos, normalmente secretado pelas ilhotas de Langerhans, no pâncreas. A principal função da insulina é na regulação da homeostase da glicose, promovendo sua captação da circulação, pela translocação dos transportadores de glicose do citoplasma para a membrana celular, além de inibir a secreção hepática de glicose (SAMUEL e SHULMAN, 2012). A sinalização da insulina é o maior mecanismo de controle da homeostase da glicose, coordenando alguns importantes processos metabólicos, incluindo a absorção e oxidação da glicose, glicólise e síntese de glicogênio em quase todos os tecidos do corpo (SALTIEL, 2001). Ela inicia com sua interação com o receptor específico na superfície da célula. Com isso, o receptor de insulina (IR) se auto-fosforila e ativa sua tirosina-quinase. O receptor tirosina-quinase, então, fosforila os substratos intracelulares, como o substrato de receptor de insulina (IRS). Existem quatro proteínas IRS, sendo IRS1 e IRS2 consideradas as mediadoras da ação da insulina (FRITSCHE e cols, 2008; THIRONE e cols, 2006). Após a fosforilação da tirosina, os IRSs transmitem sinais para o restante da via, resultando na ativação da via fosfatidilinositol 3quinase (PI3K) e da proteína-quinases ativada por mitógenos (MAP quinase). PI3K ativa proteína quinase B (Akt/PKB), que medeia a maioria das ações metabólicas da insulina, incluindo estimulação do transporte de glicose, síntese de glicogênio e de lipídeos (WHITE, 2006).

Em tecidos periféricos, especialmente nos músculos e no tecido adiposo, a ativação do IR possui efeitos metabólicos de curto prazo, sendo o mais importante a inserção dos transportadores de glicose na membrana plasmática (BEDINGER e ADAMS, 2015). Apesar do transporte nas células do sistema nervoso não ser mediado por transportadores dependentes de insulina, atualmente o encéfalo é reconhecido como um órgão sensível a insulina. Nele, a insulina é responsável por alterações fisiológicas e se apresenta alterada em distúrbios metabólicos, como obesidade e diabetes tipo 2 (SHWARTZ e PORTE, 2005). No encéfalo o receptor de insulina é amplamente distribuído pelas regiões, incluindo o hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral. Estudos com imunocitoquímica em cultura de neurônios e tecido fixado já demonstraram que há presença de IR na membrana plasmática neuronal, especificamente nas membranas pré e pós-sinápticas (WEYHENMEYER e cols., 1985; MARKS e cols., 1988; ABBOT e cols., 1999; DE FELICE e cols., 2009; ZHAO e cols.,

2009). Os IR estão presentes em altas concentrações nos neurônios e em níveis reduzidos na glia (SCHWARTZ e cols., 1992).

Apenas uma pequena fração de insulina no encéfalo é derivada de uma rápida liberação de suas próprias células. A detecção de imunoreatividade do peptídeo C em neurônios humanos (DORN e cols., 1982 e 1983) e pró-insulina ou RNA mensageiro de pré pró-insulina em cultura celular neuronal (BIRCH e cols., 1984; GHASEMI e cols., 2013) sugere a possibilidade da síntese de insulina no encéfalo. Entretanto, se essa produção é periférica, central ou ambas, ainda não foi elucidado. A maior parte da insulina cerebral é produzida pelas células beta-pancreáticas e transportada pela barreira hemato-encefálica por difusão (BANKS e cols., 1997; BANKS e KASTIN, 1998; GRAY e cols., 2014). Diversos estudos em modelos animais demonstraram que a diminuição no transporte de insulina pela barreira hemato-encefálica é encontrada em organismos com obesidade associada a resistência à insulina, assim como em diversos extremos fisiológicos, incluindo fome extrema, hiperglicemia, ativação do sistema imunológico e hibernação, sugerindo uma importante função dessa barreira na manutenção da homeostase (REGER e cols., 2006).

Foi demonstrado que a sinalização de insulina tecido-específica é modulada sob condições variadas e essa regulação distinta é importante para a homeostase de todo o organismo (BENITO, 2011). Entretanto, a fosforilação sítio-específica dos IR e IRSs ainda não foi elucidada sistematicamente em neurônios. Enquanto na glia, a insulina regula principalmente a absorção de glicose (CLARKE e cols., 1984), nos neurônios ela está envolvida com homeostase energética, reprodução, doenças neurodegenerativas e memória (PLUM e cols., 2005; BANKS e cols., 2012).

Chen e colaboradores (1975) já haviam sugerido que a insulina do SNC exerce uma retro-alimentação positiva na secreção de insulina pelo pâncreas e, então, a introdução de um modelo experimental com aplicação intranasal de insulina proporcionou uma ferramenta para avaliar seu papel no SNC humano no metabolismo do organismo como um todo. Partindo do princípio que a insulina possui função da redução dos níveis de glicose, uma das questões pendentes era se a administração de insulina via intranasal afeta os níveis de glicose como um todo, direta ou indiretamente, em humanos. Born e colaboradores (2002) demonstraram que a administração intranasal de insulina reduziu os níveis de glicose no líquido cefalorraquidiano, mas não promoveu alterações na corrente sanguínea. Entretanto, outros estudos revelaram que esse modelo aumentou os níveis de insulina circulante e reduziu a glicose, embora os níveis ainda permaneçam em euglicemia (STOCKHORST e cols., 2011; HENI e cols., 2012). A diferença nos resultados entre esses estudos pode ter acontecido devido a dose utilizada ou a

duração da terapia. Uma vez que uma das funções da insulina no hipotálamo é regular a produção hepática de glicose (OBICI e cols., 2002), é possível sugerir que a insulina no sistema nervoso central em humanos possui uma função na regulação sistêmica de glicose sanguínea pelo eixo encéfalo-fígado. De fato, evidências experimentais demonstraram que a deleção específica do receptor de insulina no encéfalo levou camundongos a resistência sistêmica a insulina, demonstrando sua função na regulação da homeostase metabólica (BRUNING e cols., 2000).

As Ilhotas de Langerhans, em resposta adaptativa a desafios ambientais que podem ocorrer durante o período perinatal, podem passar por alterações significativas durante o desenvolvimento. O crescimento pancreático e sua função podem sofrer programação devido a nutrição materna reduzida em diversas espécies, incluindo rato (GAROFANO e cols., 1998; REUSENS e cols., 2006; MORIMOTO e cols., 2012), ovelha (RHODES e cols., 2009; TODD e cols., 2009) e primatas não-humanos (CHOI e cols., 2011). Isso pode resultar em alterações persistentes do fenótipo e, então, levando a efeitos permanentes (HANSON e cols., 2014; VICKERS, 2014; OZANNE e CONSTÂNCIA, 2007). Por esse motivo, as proles de mães desnutridas possuem predisposição para doenças metabólicas, como diabetes e obesidade (ONG e OZANNE, 2015).

Esses efeitos podem ser observados também no SNC. Em hamsters, uma dieta rica em frutose induziu não apenas a resistência insulínica periférica, mas também neuronal, evidenciada pela redução do IR mediada por insulina, substrato 1 de receptor de insulina (IRS1) e fosforilação de Akt, além de níveis elevados na expressão da proteína tirosina-fosfatase 1B no córtex cerebral e hipocampo (MIELKE e cols., 2005). A LTD induzida por insulina também se apresentou atenuada no encéfalo desses animais, sugerindo que a resistência à insulina no SNC pode contribuir com prejuízos cognitivos (MIELKE e cols., 2005). Ratos que passaram por uma dieta hiperlipídica também apresentaram sinalização de insulina nos neurônios e LTD prejudicadas no CA1 do hipocampo (PRATCHAYASAKUL e cols., 2011).

A insulina também possui função na formação da circuitaria neuronal, manutenção sináptica, sobrevivência neuronal, arborização dendrítica, aprendizado e memória (BANKS e cols., 2012), modulação da plasticidade sináptica (CHIU e CLINE, 2010; BOYD e cols., 1985), controle da absorção, liberação e degradação de norepinefrina e dopamina (SAUTER e cols., 1983; BOYD e cols., 1985; KÖNNER e cols., 2011; KLEINRIDDERS e cols., 2015) e regulação da sensibilidade de receptores pós-sinápticos (LIU e cols., 1995; WAN e cols., 1997;CHRISTIE e cols., 1999; ZHAO e cols., 1999; BEATTIE e cols., 2000; MAN e cols.,

2000; PASSAFARO e cols., 2001; SKEBERDIES e cols., 2001; Huang e cols., 2003; O'MALLEY e cols., 2003; AHMADIAN e cols., 2004; DOU e cols., 2005; LEE e cols., 2005; CARAISCOS e cols., 2007; CHIU e cols., 2008; JIN e cols., 2011; LEE e cols., 2011; DIXON-SALAZAR e cols., 2014; GRILLO e cols., 2015). Entretanto, Schubert e colaboradores (2004) em um estudo com camundongos nocaute para IR neurônio-específico, não encontrou alterações na sobrevivência neuronal, metabolismo basal de glicose no encéfalo ou memória.

As sinapses hipocampais são enriquecidas de IR, onde elas regulam a plasticidade sináptica através de interações com o sistema glutamatérgico. Ela melhora a transmissão sináptica mediada por NMDA (LIU e cols., 1995), promove a expressão desse receptor na superfície celular (SKEBERDIS e cols., 2001) e estimula a fosforilação das subunidades GluN2A (Receptor 2A NMDA) e GluN2B (Receptor 2B NMDA) no hipocampo (CHRISTIE e cols., 1999). Deficiência de substrato 2 do receptor de insulina (IRS2) leva a disfunção no receptor NMDA e a menor fosforilação das subunidades tirosina de GluN2B após indução de LTP (MARTIN e cols., 2012).

Embora seja bem documentado que a insulina estimula a endocitose de AMPAr (MAN e cols., 2000; LIN e cols., 2000; BEATTIE e cols., 2000; ZHOU e cols., 2001), o que causa LTD, também existem registros de que ela é capaz de promover o tráfego extra-sináptico de membrana de receptores Glur-1 em cultura de neurônios (PASSAFARO e cols., 2001) e este tráfego é regulado pela fosforilação da serina 845 do receptor (OH e cols., 2006). O Glur-1 extra-sináptico regula a LTP ao formar uma reserva de receptores "iniciados", que podem rapidamente ser incorporados nas sinapses por estimulação dos receptores NMDA para melhorar a força sináptica (DERKACH e cols., 2007).

## 1.4 Justificativa

A malnutrição, até os dias de hoje, representa um grave problema de saúde, principalmente nos países subdesenvolvidos. Países onde milhões de pessoas vivem abaixo da linha da pobreza, podem chegar a apresentar até 35% da população em estado de desnutrição crônica.

Além dos efeitos imediatos, a malnutrição proteica nos estágios iniciais da vida pode causar efeitos tardios, danificando o desenvolvimento e até mesmo aumentando o risco de
algumas doenças durante a senescência. Um dos órgãos afetados por essa restrição é o pâncreas, onde há comprometimento das células  $\beta$ -pancreáticas, levando a deficiência de insulina na vida adulta e, até mesmo, obesidade.

A insulina é importante no SNC, onde participa do processo de LTP e LTD, a base da formação da memória hipocampal. As sinapses no hipocampo são enriquecidas de IR e lá elas regulam a plasticidade sináptica através de interações com o sistema glutamatérgico. O tráfego do receptor Glur-1 é regulado pela fosforilação da sua serina 845, que também potencializa a função do canal iônico ao aumentar sua permeabilidade e duração de abertura.

Considerando que os animais submetidos ao modelo de administração de dieta 0% de proteína apresentam alterações na morfologia do hipocampo, assim como alterações na memória e aprendizado, é de interesse investigar se esses animais apresentam alterações nos níveis de IRS1 no hipocampo, assim como alterações na distribuição do receptor Glur-1fosforilado na serina 845.

## 2 **OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da malnutrição proteica, restrita aos dez primeiros dias de lactação da rata, em moléculas associadas à sinalização de insulina e fosforilação de receptores AMPA no hipocampo da prole.

## 2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos no desenvolvimento da massa corporal da prole;
- b) Avaliar os níveis da proteína IRS1 no hipocampo da prole ao final da dieta e na vida adulta;
- c) Avaliar a distribuição de pGlur-1 (Ser 845) pelas regiões do hipocampo da prole ao final da dieta e na vida adulta da prole através de imuno-histoquímica;
- d) Avaliar o número de neurônios de forma a avaliar possíveis efeitos restritos à população de neurônios pGlur-1 positivos.

## **3 METODOLOGIA**

#### 3.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos Wistar produzidos e mantidos no biotério de animais do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais tiveram acesso à ração de acordo com seu grupo experimental, livre acesso à água, e foram mantidos em temperatura ambiente controlada a 25°C, com ciclo claro e escuro de 12 horas (07h00min – 19h00min). O protocolo experimental utilizado, descrito a seguir, foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, sob os números CEA/005/2009 e CEUA/30/2016.

## 3.2 Instalação da malnutrição

Os acasalamentos foram promovidos através do pareamento de três fêmeas adultas com dois machos adultos em cada caixa. À medida que a gravidez era constatada, as fêmeas grávidas eram separadas em caixas individuais para acompanhamento e determinação do dia do nascimento da prole. Após o nascimento, as progenitoras eram divididas em três grupos: grupo controle (GC), grupo malnutrido (GM) e grupo *pair-fed* (GPF).

Após a avaliação do sexo dos animais da prole através da medida da distância anogenital como parâmetro de distinção, as ninhadas foram organizadas em grupos de seis filhotes machos por nutriz. As nutrizes do grupo controle receberam ração comercial (Nutrilab) contendo 22% de proteínas durante todo período gestacional e de desenvolvimento da prole, enquanto as nutrizes do grupo malnutrido receberam ração aproteica (0% de proteínas), produzida no laboratório, a partir do nascimento até o décimo dia de lactação. Já as nutrizes do grupo *pair-fed*, foram alimentadas com uma quantidade reduzida de ração (12g da ração com 22% de proteína por dia) até o décimo dia pós-natal (P) (MARCELINO e cols., 2004). A quantidade diária de ração para o GPF foi posta todos os dez dias às 17h. Após este período, as nutrizes de todos os grupos experimentais passaram a ter livre acesso a ração com

22% de proteína. A prole de todos os grupos, após o desmame, continuou a receber ração com22% de proteína. A figura 8 resume o desenho experimental.



Figura 8 - Representação esquemática do modelo experimental

Legenda: GC – Grupo Controle; GM – Grupo Malnutrido; GPF – Grupo *Pair-fed*. P0 – nascimento da ninhada e início do modelo experimental; P10 e P60 – idade de processamento de amostras; P21 – idade de desmame das ninhadas; Em preto – ração comercial à vontade; Em vermelho – ração 0% proteína para as nutrizes; Em verde – 12g de ração diária para as nutrizes.

A ração aproteica diverge da comercial, além da ausência de proteínas, no percentual de proteínas e carboidratos (Tabela 2), que estão aumentados no intuito de compensar a quantidade de calorias relativa à falta de proteína. A tabela 3 detalha os ingredientes e o modo de preparo da ração.

Nutrientes	Comercial	Manipulada
Proteína	22%	0%
Carboidratos	72,6%	88,9%
Lipídeos	5,4%	11,1%
Kilocalorias	4,21 Kcal/g	4,05 Kcal/g
Vitamina A	12000 Ui	11000 Ui
Vitamina D <sub>3</sub>	1800 Ui	2000 Ui
Vitamina E	30 mg	40 mg
Vitamina K <sub>1</sub>	*	10 mg
Vitamina B <sub>1</sub>	5 mg	5 mg

Tabela 2 - Composição das rações comercial e manipulada

Vitamina B <sub>2</sub>	9 mg	10 mg
Vitamina B <sub>6</sub>	7 mg	10 mg
Vitamina B <sub>12</sub>	20 mg	20 mg
Ácido Fólico	1 mg	2 mg
Biotina	1,5 mg	2,5 mg
Nicotinamida	*	50mg
Niacina	60 mg	60 mg
Ácido Pantotênico	20 mg	25 mg
Ferro	50 mg	50 mg
Zinco	60 mg	58 mg
Cobre	10 mg	10 mg
Manganês	60 mg	50 mg
Cálcio	*	4207 mg
Potássio	*	2765 mg
Sódio	*	1226 mg
Magnésio	*	606 mg

Nota: <sup>3</sup>	* dados	não	informados.	Fonte:	Costa,	2000.
--------------------	---------	-----	-------------	--------	--------	-------

Ingredientes					
Amido de Milho	900 g				
Complexo B	15 ml	8	]		
		<sup>o</sup> Mistura de Sais			
Vitamina D3 e A (Aderogil®)	2 ml	Carbonato de Cálcio	87 g		
		Fosfato de potássio dibásico	123 g		
Vitamina K	1 ml	Fosfato de cálcio	28 g		
		Sulfato de magnésio	32 g		
Vitamina E	1 ml	Cloreto de sódio	49 g		
		Citrato férrico	2 g		
Vitamina C	5 ml	Iodeto de potássio	0,2 g		
		Sulfato de manganês	0,2 g		
Vitamina B12	1 ml	Sulfato de zinco	0,09 g		
		Sulfato de cobre	0,09 g		
Ácido Fólico	2 mg				
Óleo de soja	50 ml				
Mistura de Sais <sup>a</sup>	32 g				

Tabela 3 - Composição e modo de preparo da ração artesanal utilizada

Nota: Ingredientes para o preparo de 1 Kg de ração. Misturar os sais e o amido de milho, reservar. Diluir as vitaminas no óleo de soja e acrescentá-los à mistura. Adicionar água destilada até dar o ponto para formar o biscoito, para então assar. O quadro inserido detalha a mistura de sais.

Fonte: Costa, 2000.

### 3.3 Avaliação da ingestão alimentar e massa corporal

No primeiro dia de vida da prole (P0), foi disponibilizado para a nutriz do GC ou do GM 200g de ração comercial ou ração 0% proteína, respectivamente. Em cada um dos dez dias seguintes a ração restante foi pesada às 17h e os valores anotados. Foi disponibilizado mais 50g de ração sempre que o total disponível para a nutriz fosse inferior a 100g, de forma a sempre manter alimento disponível para essas nutrizes.

Após o fim do trabalho de parto (P0) e com as ninhadas já propriamente ajustadas, a massa corporal das nutrizes foi obtida. Todas as nutrizes foram pesadas mais uma vez dez dias depois e imediatamente antes da troca da dieta no caso dos grupos GPF e GM.

Os filhotes de todas as nutrizes foram pesados a cada dois dias às 17h até o décimo dia pós-natal (P0, P2, P4, P6, P8 e P10). Após esse período, a prole continuou a ser pesada entre as idades de 15 e 60 dias pós-natal (P15, P20, P30, P45 e P60).

Todas as pesagens foram realizadas utilizando uma balança de precisão.

## 3.4 Perfusão

Ratos da prole nas idades P10 e P60 (n = 4 por idade em cada grupo) foram anestesiados com pentobarbital (50mg/Kg), tiveram sua caixa torácica aberta por remoção do gradil costal para a exposição do coração e uma cânula foi inserida no ventrículo esquerdo por onde as soluções para perfusão/fixação foram infundidas, que escoaram por um pequeno orifício feito no átrio direito após percorrerem o sistema vascular do animal. As soluções utilizadas foram: solução salina 0,9%, visando a remoção do sangue do animal; solução de paraformaldeído 4% (em tampão fosfato 0,1M pH 7,4), solução fixadora visando a preservação tecidual; e solução de paraformaldeído 4% acrescida de sacarose a 10%, iniciando, assim, o processo de crioproteção. A salina foi infundida a temperatura fisiológica do animal (38°C) para reduzir a vasoconstricção. Ao término deste processo, iniciou-se a dissecção do encéfalo para o período de pós-fixação, sendo o mesmo armazenado em solução fixadora acrescida de 10% de sacarose, a temperatura de 4°C durante 2 horas. Posteriormente, o encéfalo foi transferido para solução de tampão fosfato 0,1M pH 7,4 com 20% de sacarose e mantido a 4°C durante a noite.

## 3.5 Criossecção

Para realizar a criossecção, os cérebros foram embebidos no composto *Optimal Cutting Temperature* (OCT), sendo congelados posteriormente em nitrogênio líquido e cortados em seguida em criótomo a -20°C. Cortes de 20µm em plano coronal foram recolhidos de forma seriada (cortes adjacentes em lâminas adjacentes) em lâminas cobertas com gelatina-alúmen de cromo 2%, para posterior reação imunohistoquímica, e armazenados a -20°C. Para aperfeiçoar a análise comparativa entre os grupos e garantir a semelhança anatômica entre os cortes dos encéfalos dos animais, iniciou-se o recolhimento dos mesmos a partir da altura correspondente ao Bregma -3,14 (Paxinos e Watson, 1998), utilizando os ventrículos laterais e terceiro ventrículo como parâmetros de orientação.

A identificação da citoarquitetura e a terminologia das áreas do hipocampo seguiram os critérios estabelecidos por Paxinos e Watson (1998) para animais adultos (Bregma -3,14 a - 4,3mm), conferido com o atlas de animais em desenvolvimento (Sherwood e Timiras, 1970).

## 3.6 Imunohistoquímica

As lâminas foram lavadas 6 vezes por 5 minutos em tampão fosfato salina (PBS) 0,1M pH 7,4 acrescidas de triton 0,1%. Após as lavagens, estas lâminas foram incubadas em albumina do soro bovino (BSA) 5% em PBS 0,1M pH 7,4 por 1 hora para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida, foram aplicados anticorpos primários policionais anti- pGlur-1 (Ser 845) produzidos em coelho (Thermo Fisher) e monocionais anti-NeuN produzidos em camundongo (Millipore), ambos em concentrações de 1:200, e diluídos em PBS 0,1M pH 7,4 por 3 horas em temperatura ambiente, prosseguido de incubação durante a noite a 4°C.

No segundo dia, as lâminas passaram por 6 lavagens de 5 minutos com PBS 0,1M pH 7,4 para, então, serem incubadas com anticorpos secundários anti-coelho conjugados ao fluorocromo Alexa Fluor 488 (Millipore) e anti-camundongo conjugados ao fluorocromo Alexa Fluor 555 (Millipore), ambos produzidos em cabra, em concentrações de 1:400 e 1:500, respectivamente, diluídos em PBS 0,1M pH 7,4. Após 1 hora, o excesso de anticorpos foi removido das lâminas em 6 lavagens de 5 minutos com PBS 0,1M pH 7,4. Ao término deste processo, as lâminas foram montadas utilizando N-propil-galato. As imagens foram obtidas com uma câmera digital acoplada a um microscópio de epifluorescência Olympus BX40.

#### 3.7 Quantificação de células

Para a realização da quantificação, foram utilizados quatro animais (n=4) por grupo e idade. A metodologia de quantificação para pGlur-1 e NeuN foi idêntica. Para capturar as

imagens foi utilizada uma objetiva cujo aumento era de 20X. Para a quantificação foi definida uma gratícula composta por 25 quadrados, cuja área corresponde a  $62500\mu m^2$ , sendo, portanto, cada lado do quadrado 250  $\mu m$ . O objetivo de uma área de contagem grande foi obter o maior número de células imunomarcadas possível. A gratícula foi padronizada, respeitando as características morfológicas e dimensões de cada região hipocampal. Para CA1 e CA3 foi quantificada uma área total de  $62500\mu m^2$ . Apenas para o GD foram posicionadas três gratículas para contagem de células, a fim de abranger as camadas molecular, granular e polimórfica, sendo quantificada uma área total de  $187500 \mu m^2$ . Após o posicionamento, as imagens foram ampliadas (100X) e as células imunomarcadas para pGlur-1 ou NeuN foram contadas manualmente no interior de cada campo em três cortes do mesmo animal em cada uma das regiões. A quantificação foi realizada utilizando o software Image Pro-Plus a partir da definição das áreas de interesse (AOIs) (Figura 9).

Figura 9 - Posicionamento das áreas de interesse para quantificação



Legendas: A – CA1; B – CA3; C – GD. As gratículas e as AOIs foram posicionadas em imagens de aumento de 20X e a contagem realizada em aumento de 100X.

#### 3.8 Coleta de Amostra para Western Blot

Ratos de cada prole nas idades P10 e P60 (n = 4 por idade em cada grupo) foram anestesiados com pentobarbital (50mg/Kg), decapitados e tiveram seus encéfalos dissecados. O hipocampo foi cuidadosamente dissecado, imergido em PBS 0,1M a 4°C para preservação do tecido. Após a retirada, o material foi pesado numa balança analítica e colocado em eppendorfs previamente identificados, congelados com nitrogênio líquido e armazenados a temperatura de -70°C.

### 3.9 Análise de Proteínas

Os hipocampos previamente dissecados foram macerados cuidadosamente com 200 a 300 µl de tampão de lise a 4°C, centrifugados por 10 segundos a 10000 rpm em centrífuga refrigerada e foi recolhido seu sobrenadante.

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o Método de Bradford em placa de 96 poços. As placas foram analisadas em espectofotômetro no comprimento de onda de 570nm. O fator de cálculo (FC) foi calculado a partir da curva padrão de albumina, onde: FC = concentração de albumina ( $\mu g/\mu l$ )/Absorbância. O FC médio foi calculado e a absorbância da amostra multiplicada por esse valor. O volume de cada amostra a ser utilizado na etapa de eletroforese foi calculado e ajustado de forma que fosse mantido um valor de 20 $\mu g$  de proteína total.

#### 3.10 Eletroforese e Western Blot

As amostras foram diluídas em tampão de amostra de forma à solução ficar com uma concentração de 80% do volume total. As amostras sofreram desnaturação por meio de fervura por 3 minutos. O volume previamente calculado da amostra foi aplicado em poços no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para corrida de eletroforese no sistema Bio-rad, além de géis em concentrações variando de 5% a 12%. Padrão de peso molecular Full Range Rainbow (GE Healthcare) também foi adicionado no primeiro poço de cada gel. Após a aplicação, a fonte foi ajustada para 150 V e 50mA. A corrida foi realizada por cerca de uma hora e meia.

Para a transferência de proteínas do gel de eletroforese para a membrana de nitrocelulose, foi utilizada uma cuba de transferência iBlot (Life Technologies). A fonte foi ajustada para 70V e 300mA. Após sete minutos, a transferência foi concluída, o gel descartado e a membrana colocada em uma vasilha e lavada com água destilada por 3 minutos em um agitador orbital.

Na etapa de imunodetecção, a membrana foi primeiramente incubada com BSA em diluição de 2% em T-TBS (Tampão Tris Tween Salina) por trinta minutos sob agitação orbital, para bloqueio. Posteriormente, o BSA foi descartado e a membrana incubada com

anticorpo primário produzido em coelho anti-IRS1 1:1000 em T-TBS durante 2 horas. E, então, a membrana foi guardada na geladeira durante a noite. No dia seguinte, foram realizadas três lavagens com T-TBS por cinco minutos sob agitação constante. A membrana foi incubada com anticorpo IgG produzido em cabra anti-coelho biotinilado 1:1000 em T-TBS por 1h no agitador orbital e mais uma vez lavada três vezes por cinco minutos sob agitação. Para a última incubação, foi utilizada estreptavidina conjugada com peroxidase 1:1000 em T-TBS por 1h sob agitação e posteriormente lavada mais três vezes por cinco minutos. Para o controle de carregamento, foi utilizada a mesma metodologia utilizando como anticorpo primário produzido em coelho anti-Actina 1:1000.

As membranas foram reveladas com DAB (Tetra-hidrocloreto de 3,3'diaminobenzidina) (5mg em 10ml de Tampão Tris 0,1M pH 7,4) utilizando o aparelho ChemiDoc e o software ImageLab.

### 3.11 Quantificação das bandas de Western Blot

Para a realização da quantificação, foram utilizados quatro animais (n=4) por grupo e idade. As imagens obtidas com o software ImageLab foram analisadas com o software ImageJ. Foi selecionado um retângulo que incluísse todas as bandas do gel e, em seguida, foram realizados dois comandos, selecionar a primeira linha e selecionar a próxima linha, a partir da guia *Analyze* > *Gels* > *Select First Lane* e *Analyze* > *Gels* > *Select Next Lane*. Após essas etapas, o software foi capaz de demonstrar linhas de curva, cuja área representa o valor quantitativo dos níveis de IRS1 para cada banda, com o comando *Analyze* > *Gels* > *Plot Lanes*.

Foram traçadas linhas verticais entre duas linhas de curva, cada uma representando uma banda, de forma a conseguir selecionar cada uma delas individualmente com a ferramenta Varinha Mágica (*Magic Wand*, no software em inglês), que automaticamente apresentava a área da figura.

## 3.12 Análise estatística

Os dados são apresentados na forma de médias e erro padrão da média. O limite de significância adotado foi de P < 0,05. Para verificar a normalidade de todas as análises, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS Statistics.

Para averiguar a significância entre os grupos na massa corporal materna, da prole e ingestão alimentar, foi utilizada ANOVA de repetição com pós-teste de Bonferroni.

Para avaliar os níveis de IRS1, usou-se ANOVA univariada.

Para os resultados de imunomarcação foi utilizada ANOVA multivariada. Resultados com valor de P inferior a 0,05 foram submetidos ao pós-teste de Bonferroni.

#### **4 RESULTADOS**

#### 4.1 Efeitos na nutriz

## 4.1.1 Massa corporal da nutriz

De forma a comprovar que as nutrizes possuíam mesma massa corporal antes de submetê-las ao estudo, todas elas foram pesadas após o nascimento de sua prole, antes de implementar o modelo experimental. Como é possível observar na Tabela 4, não há diferença significativa entre a massa das nutrizes em P0. Dessa forma, é possível inferir que a massa corporal da mãe anterior a implementação do modelo não se estabeleceu como uma variável ao estudo.

Também foi avaliada a massa corporal das nutrizes após o período de dieta, em P10. Todos os grupos possuíam diferença significativa entre P0 e P10 (P < 0,001), avaliado com teste t de Student entre as idades, sendo possível observar que, enquanto as nutrizes do GC engordaram nesse período, as nutrizes do GM e GPF perderam massa corporal. Com isso, foi observado que as nutrizes do GM e do GPF após os dez primeiros dias de lactação possuíam redução significativa em relação ao GC, comprovando que esse modelo alterou a composição corporal da nutriz.

201	
PO	P10
277,71±13,16	300,92 ± 14,88***
279,58±22,68	209,83 ± 15,77*** ***
281,72±13,18	217,89 ± 9,96*** **
	277,71±13,16 279,58±22,68 281,72±13,18

Tabela 4 – Massa corporal das nutrizes

Legenda: Massa corporal (g) da nutriz. \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001

## 4.1.2 Ingestão Alimentar

A ANOVA de medidas repetidas indicou significância entre os grupos Controle x Malnutrido e Controle x *Pair-fed* (P < 0,001).

Em virtude disso, foi realizado o pós-teste de Bonferroni de forma a comparar a ingestão alimentar entre os grupos para cada idade (Tabela 5). A nutriz do GPF apresentou menor ingestão em todos os dez dias de lactação comparada com a do GC. A ingestão de ração pela nutriz já estava alterada entre GC e GM a partir de P3 da prole, quando foi possível observar redução na quantidade de ração ingerida da nutriz malnutrida em relação a controle. Com o passar dos dias, foi possível observar que a diferença entre esses dois grupos permaneceu. Também foi observado redução de GPF em relação a GM, apenas no primeiro dia de lactação.

Para saber se a diferença entre GM e GPF afetou a ingestão total de ração pela nutriz até os dez primeiros dias de vida de sua prole, foi comparada a ração total ingerida pela nutriz até P10 usando ANOVA uni-variada e pós-teste de Bonferroni (Figura 10). Verificou-se diferença significativa total entre todos os grupos (GC 353,61g  $\pm$  17,96, GM 168,43g  $\pm$  7,44, GPF 120g).

Dadas as diferenças entre os grupos GM e GPF, isso não permite utilizar o grupo GPF como controle calórico e sim, na verdade, como um grupo de restrição calórica. Contudo, continuaremos utilizando a nomenclatura *pair-fed*.

Olupo   P1   P2   P3   P4   P5   P6   P7   P8   P9     GC   21,16±1,37   22,66±2,72   27,81±2,19   39,81±6,46   34,2±5,93   36,8±2,38   42,38±3,31   37,7±4,83   48,66±3,0     GM   29,36±2,12   19,83±1,11   18±1,72   15,30±0,85   19,08±0,77   14,09±2,85   15,51±1,22   13,4±1,36   13,4±1,36     GM   29,36±2,12   19,83±1,11   18±1,72   15,30±0,85   19,08±0,77   14,09±2,85   15,51±1,22   12,74±0,98   13,4±1,36     GPF   12	Contract	5				Ulas pos-r	India				
GC 21,16±1,37 22,66±2,72 27,81±2,19 39,81±6,46 34,2±5,93 36,8±2,38 42,38±3,31 37,7±4,83 48,66±3,0   GM 29,36±2,12 19,83±1,11 18±1,72 15,30±0,85 19,08±0,77 14,09±2,85 15,51±1,22 12,74±0,98 13,4±1,36   GPF 12 12 12 12 12 12 12 12   GF 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12   s** *** ** ** ** **	odnio	P1	P2	P3	P4	P5	9d	ΡŢ	P8	6d	P10
GM 29,36±2,12 19,83±1,11 18±1,72 15,30±0,85 19,08±0,77 14,09±2,85 15,51±1,22 12,74±0,98 13,4±1,36 *** *** *** *** *** *** *** *** *** **	9C	$21,16 \pm 1,37$	22,66±2,72	27,81±2,19	39,81±6,46	34,2±5,93	36,8±2,38	$42,38 \pm 3,31$	37,7±4,83	48,66±3,07	42,4±2,5
GPF 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12	GM	29,36±2,12	19,83±1,11	18±1,72	15,30±0,85	19,08±0,77	14,09±2,85	15,51±1,22	12,74±0,98	$13,4 \pm 1,36$	$11, 1 \pm 1, 6($
GPF   12				***	**	*	***	***	***	***	***
*** ** ** ** ** ** ** ** **	GPF	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		#/**	**	***	*	*	***	***	***	***	***

· •
5
in
~
a
÷
C
Ð
-
0
5
9
V
0
11-
-
-T
0
0
õ
N/
~
ц.
*
×
*
-
0
-
0
V
0
*
*
S
0
c'
~
V
0
*
10
PP-
Ë
-
-
0
5
0
(T)
3
S
TO .
σ
-
E C
T
-
T
1-50
oós-r
pós-r
as pós-r
ias pós-r
dias pós-r
s dias pós-r
os dias pós-r
n os dias pós-r
m os dias pós-r
om os dias pós-r
com os dias pós-r
o com os dias pós-r
do com os dias pós-r
ordo com os dias pós-r
cordo com os dias pós-r
acordo com os dias pós-r
e acordo com os dias pós-r
le acordo com os dias pós-r
: de acordo com os dias pós-r
iz de acordo com os dias pós-r
triz de acordo com os dias pós-r
utriz de acordo com os dias pós-r
nutriz de acordo com os dias pós-r
a nutriz de acordo com os dias pós-r
la nutriz de acordo com os dias pós-r
ela nutriz de acordo com os dias pós-r
pela nutriz de acordo com os dias pós-r
a pela nutriz de acordo com os dias pós-r
da pela nutriz de acordo com os dias pós-r
rida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
erida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
gerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
ngerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
<li>g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r</li>
(g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
o (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
ão (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
ção (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
ação (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
le ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
a de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
sa de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
issa de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
lassa de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
Massa de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
:: Massa de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
la: Massa de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
ıda: Massa de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
enda: Massa de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
genda: Massa de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r
egenda: Massa de ração (g) ingerida pela nutriz de acordo com os dias pós-r

# Tabela 5 – Ingestão alimentar da nutriz.

Figura 10 – Ingestão acumulada das nutrizes até P10 da sua prole



Legenda: Massa de ração (g) ingerido pela nutriz até P10 da sua prole (n=6). \* P < 0,05 \*\*\* P < 0,001.

#### 4.2 Efeitos na prole em P10

## 4.2.1 Evolução da massa corporal da prole

A fim de avaliar se a massa corporal da prole é afetada, as ninhadas foram pesadas a cada dois dias até P10 (Figura 11). A análise com ANOVA de repetição mostrou que há interação entre Idade X Grupo (F = 61,867, gl = 10, p < 0,001). A ANOVA multivariada com pós-teste de Bonferroni, então, demonstrou redução significativa no GM em relação ao GC a partir de P4 (P4: GC 12,04  $\pm$  0,22, GM: 8,76  $\pm$  0,42, P < 0,001; P6: GC 15,5  $\pm$  0,37, GM 9,58  $\pm$  0,49, P < 0,001; P8: GC 19,11  $\pm$  0,48 GM 9,93  $\pm$  0,56, P < 0,001; P10: GC 22,81  $\pm$  0,56, GM 10,36  $\pm$  0,83, P < 0,001). O GPF, por sua vez, afetou a massa da prole mais tardiamente, sendo observada redução significante a partir de P6 (P6: GC 15,5  $\pm$  0,37, GPF 12,14  $\pm$  0,83, P < 0,01; P8: GC 19,11  $\pm$  0,48, GPF 12,89  $\pm$  1,04, P < 0,001; P10: GC 22,81  $\pm$  0,56, GPF 13,3  $\pm$  1,2, P < 0,001). Entre os grupos GM e GPF a diferença foi observada apenas em P4, P6 e P8, com o GM apresentado massa significantemente reduzida (P4: GM 8,76  $\pm$  0,42 GPF 10,52  $\pm$  0,63, P < 0,05; P6: GM 9,58  $\pm$  0,49, GPF 12,14  $\pm$  0,83, P < 0,05; P8: GM 9,93  $\pm$  0,56, GPF 12,89  $\pm$  1,04, P < 0,05).





Legenda: Massa corporal (g) da prole (n=6). \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, # P < 0,05 entre GM e GPF.

### 4.2.2 Níveis de IRS1 no hipocampo

A ANOVA univariada não demonstrou diferença significante entre os grupos para os níveis de IRS1 no hipocampo da prole em P10 (uANOVA: F = 0,05, gl = 2, P > 0,05). Dessa forma, é possível inferir que o nosso modelo de malnutrição proteica não causa um efeito sobre os níveis de IRS1 no hipocampo da prole logo ao fim da administração da dieta às nutrizes (Figura 12).

Figura 12 - Níveis de IRS1 no hipocampo da prole GC, GM e GPF em P10



Legenda: Densidade óptica de IRS1 no hipocampo em P10, em UA (unidades arbitrárias). Observe que não há diferença estatisticamente significante entre os grupos (GC 0,857  $\pm$  0,115; GM 0,851  $\pm$  0,679; GPF 0,844  $\pm$  0,74). P > 0,05.

## 4.2.3 Imunomarcação de NeuN e pGlur-1 (Ser 845) no hipocampo

## 4.2.3.1 Corno de Ammon 1

A análise qualitativa da imuno-histoquímica para NeuN e pGlur-1 não revelou diferenças aparentes entre os grupos. A imunomarcação para pGlur-1 está presente principalmente na camada piramidal em todos os grupos (Figura 13).

Figura 13 – Imunomarcação de NeuN e pGlur-1 no CA1 em ratos P10.



Legenda: A, C e E – imuno-histoquímica para NeuN; B, D e F – imuno-histoquímica para pGlur-1. Setas indicando células positivas para pGlur-1. Barra de calibração:  $100 \mu m$ .

A ANOVA multivariada (NeuN: F = 0,624 gl = 2 P > 0,05; pGlur-1: F = 0,75 gl = 2 P = 0,05; Razão: F = 0,272 gl = 2 P > 0,05; n = 4 em todos os grupos) não revelou alterações no CA1 em P10 em nenhum dos grupos em relação ao número de células NeuN e pGlur-1 positivas e nem na razão dessas células com o número de neurônios (Figura 14).





Legenda: Não há diferença significativa entre os grupos em nenhuma variável abordada (NeuN: GC 93,02 ± 5,97, GM 103,5 ± 8,89, GPF 95,53 ± 5,38; pGlur-1: GC 45,9 ± 4,27, GM 55,41 ± 2,74, GPF 48,11 ± 8,56; Razão: GC 0,5 ± 0,067, GM 0,55 ± 0,053, GPF 0,5 ± 0,065). P > 0,05.

4.2.3.2 Corno de Ammon 3

Foi possível observar que a imunomarcação para NeuN no GM apresentou uma camada piramidal menos compacta, com células mais espalhadas que os demais grupos, conferindo um aspecto frouxo. Em relação às células pGlur-1 positivas, foi observado que elas estão mais distribuídas na parte superior da camada piramidal em todos os grupos (Figura 15).





Legenda: A, C e E – imuno-histoquímica para NeuN; B, D e F – imuno-histoquímica para pGlur-1.

Setas indicando células positivas para pGlur-1 na parte superior da camada piramidal do CA3. Barra de calibração: 100 µm.

A ANOVA multivariada (NeuN: F = 0,5, gl = 2 P > 0,05; pGlur-1: F = 3,207, gl = 2 P > 0,05) no CA3 em P10 demonstra um valor de P menor que 0,05 para análise da razão entre pGlur-1 e NeuN (F = 5,681 gl = 2 P < 0,05). Sendo assim, foi feito o pós-teste de Bonferroni e, com isso, foi encontrado diferença significativa apenas entre o grupo malnutrido e o grupo *pair-fed* (GM 0,303 ± 0,054, GPF 0,567 ± 0,052 P < 0,05) inferindo que, embora nenhum deles seja diferente do grupo controle, esses insultos impactam de forma diferenciada a relação dessas imuno-marcações. Não foram encontradas diferenças significativas nas demais análises (Figura 16).

Figura 16 – Quantificação de células positivas para NeuN, pGlur-1 e a razão entre elas no CA3 em ratos P10



4.2.3.3 Giro Denteado

Mais uma vez não foram observadas diferenças na distribuição dos neurônios no GD. Os três grupos apresentam morfologia neuronal e distribuição do receptor pGlur-1 semelhantes, com maior presença na parte superior da camada granular (Figura 17).



Figura 17 – Imunomarcação de NeuN e p-Glur-1 no GD em ratos P10

Legenda: A, C e E – imuno-histoquímica para NeuN; B, D e F – imuno-histoquímica para pGlur-1. Setas indicando células positivas para pGlur-1. Barra de calibração: 100 µm.

A ANOVA multivariada (NeuN: F = 0,627, gl = 2, P > 0,05; pGlur-1: F = 0,232, gl = 2 P > 0,05; Razão: F = 0,178, gl = 2, P > 0,05) não mostrou diferença significante entre os grupos no giro denteado de ratos P10 para nenhum dos fatores variáveis (Figura 18).

Figura 18 – Quantificação de células positivas para NeuN, pGlur-1 e a razão entre elas no GD em ratos P10



Legenda: Não há diferença significativa entre os grupos em nenhuma variável abordada (NeuN: GC 341,33 ± 38,69, GM 376,05 ± 21,72, GPF 383,58 ± 21,46; pGlur-1: GC 136,39 ± 31,01, GM 159,72 ± 30,45, GPF 141,43 ± 7,94; Razão: GC 0,406 ± 0,085, GM 0,421 ± 0,071, GPF 0,368 ± 0,018). P > 0,05.

#### 4.3 Efeitos na prole em P60

#### 4.3.1 Evolução da massa corporal da prole

A ANOVA de repetição indicou que há uma interação entre grupos (F = 4,104, P< 0,001), demonstrando que a mudança na dieta da nutriz causa efeitos na massa corporal de sua prole ao longo do desenvolvimento.

Em virtude disso, foram realizados ANOVA multivariada e pós-teste de Bonferroni de forma a comparar a massa corporal entre os grupos para cada idade. Foi encontrada redução significante em relação ao GC no GM e GPF em P15, P20, P45 e P60 (Tabela 6). Não foram encontradas diferenças entre os grupos GM e GPF em nenhuma das idades testadas.

Crupo	Dias pós-natal				
Grupo -	P15	P20	P30	P45	P60
GC	32,75 ± 0,77	45,76±0,98	95,87±2,9	196,17±4,33	268,45±5,61
GM	20,67 ± 1,57	33,37±2,14	76,32±5,83	151,30±8,98	216,85 ± 13,64
GPF	22,82 ± 1,38	37,25 ± 3,14	83,06 ± 6,13	165,98 ± 12,35	5 211,6 ± 19,49
	***	***		**	*

Tabela 6 – Massa corporal da prole ao longo do desenvolvimento

Legenda: Massa corporal (g) da prole. \* P < 0,05 \*\* P < 0,01 \*\*\* P < 0,001

## 4.3.2 Níveis de IRS1 no hipocampo

A ANOVA uni-variada demonstrou que há interação entre grupos (ANOVA: F = 7,474, gl = 2, P < 0,05), portanto, foi realizado o pós-teste de Bonferroni para avaliação entre os grupos. Os resultados demonstram que há uma diferença estatisticamente significante entre o GC e o GM (Figura 19), com o GM possuindo níveis maiores de IRS1 que o GC (GC 0,46  $\pm$  0,29, GM 0,879  $\pm$  0,085, P < 0,05), e que não há diferença entre o grupo controle e *pair-fed* (GC 0,46  $\pm$  0,29, GPF 0,564  $\pm$  0,104, P > 0,05). Isso comprova que a malnutrição proteica,

não apenas a restrição calórica, é capaz de programar a prole da nutriz, ocasionando um efeito tardio no hipocampo desses animais nos níveis de IRS1.



Figura 19 - Níveis de IRS1 no hipocampo da prole em P60

Legenda: Densidade óptica de IRS1 no hipocampo em P60, em UA (unidades arbitrárias). Observe que há diferença estatisticamente significante entre os grupos GC e GM (GC: 0,46 ± 0,29; GM: 0,879 ± 0,085. GPF: 0,564 ± 0,104). \* P < 0,05

4.3.3 Distribuição de pGlur-1 (Ser 845) no hipocampo

4.3.3.1 Corno de Ammon 1

As células positivas para NeuN não apresentaram nenhuma diferença na sua distribuição nessa região. Entretanto, é interessante observar que em relação às células pGlur-1, o grupo *pair-fed* apresenta maior concentração de marcação na extremidade inferior da camada piramidal, próximo ao *stratum radiatum*. Esse padrão não foi observado nos demais grupos. O grupo malnutrido aparenta possuir maior dispersão de células marcadas para essa molécula do que os demais (Figura 20).



Figura 20 – Imunomarcação de NeuN e pGlur-1 no CA1 em ratos P60

Legenda: A, C e E – imuno-histoquímica para NeuN; B, D e F – imuno-histoquímica para pGlur-1. Setas indicando células positivas para pGlur-1. Barra de calibração:  $100 \mu m$ .

A ANOVA multivariada (NeuN: F = 0,28, gl = 2, P > 0,05; pGlur-1: F = 0,063, gl = 2, P>0,05; Razão: F = 0,017, gl = 2, P > 0,05) não encontrou diferença significante entre os grupos para os aspectos analisados. (Figura 21)





Legenda: Não há diferença significativa entre os grupos em nenhuma variável abordada (NeuN: GC 68,84 ± 5,36 GM 67,54 ± 6,79 GPF 71,3 ± 6,15; pGlur-1: GC 36,91 ± 4,61 GM 37,89 ± 6,84 GPF 40,38 ± 9,13; Razão: GC 0,572 ± 0,059 GM 0,572 ± 0,029 GPF 0,559 ± 0,076). P > 0,05

Em P60, não foi possível observar diferença no padrão de marcação de neurônios no CA3. As células positivas para pGlur-1 novamente se apresentam mais distribuídas na camada piramidal. O GM e o GPF, em relação ao GC, aparentam ter menos marcação no *stratum radiatum* (Figura 22).

Figura 22 - Imunomarcação de NeuN e pGlur-1 no CA3 em ratos P60



Legenda: A, C e E – imuno-histoquímica para NeuN; B, D e F – imuno-histoquímica para pGlur-1. Setas indicando células positivas para pGlur-1. Barra de calibração: 100 µm.

A ANOVA multivariada evidenciou efeito nos grupos para os fatores variáveis pGlur-1 (Ser 845) (F = 13,07 gl = 2, P < 0,01) e razão pGlur-1<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> (F = 8,94 gl = 2, P < 0,01). Sendo assim, foi realizado o pós-teste de Bonferroni para avaliação par a par. Foi constatado que o GM possui mais células marcadas com esse receptor fosforilado em relação tanto ao GC quanto ao GPF (GC: 34,80 ± 2,77; GM: 68,45 ± 7,31; GPF> 31,34 ± 5,94; P < 0,01). Também foi observada diferença na razão entre esses mesmos grupos (GC: 0,402 ± 0,015, GM: 0,653 ± 0,071, P < 0,05; GPF 0,321 ± 0,067, P < 0,01), o que sugere que ocorreu uma programação da via glutamatérgica devido à restrição proteica que esses animais sofreram nos seus primeiros dias de vida. A ANOVA (F = 3,942 gl = 2 P > 0,05) não evidenciou efeito para o fator NeuN (Figura 23).





Legenda: Foi encontrado um aumento na quantidade de células positivas para pGlur-1 no CA3 de ratos do grupo malnutrido em relação ao grupo controle e *pair-fed*. A razão pGlur-1/NeuN também foi aumentada nesse grupo em relação aos demais (NeuN: pGlur-1: GC: 34,80 ± 2,77; GM: 68,45 ± 7,31; GPF> 31,34 ± 5,94; Razão: GC: 0,402 ± 0,015, GM: 0,653 ± 0,071, GPF 0,321 ± 0,067). \* P < 0,05 \*\* P < 0,01

## 4.3.3.3 Giro Denteado

Os três grupos não possuem diferença na distribuição neuronal. O grupo controle aparenta concentrar as imuno-marcações de pGlur-1 (Ser 845) nas células mais internas da camada granular, próximo ao hilo, ao contrário do grupo malnutrido e *pair-fed*, que apresentam suas marcações mais dispersas pela camada, sem nenhum padrão bem definido (Figura 24).



Figura 24 - Imunomarcação de NeuN e p-Glur-1 (Ser 845) no GD em ratos P60

Legenda: A, C e E – imuno-histoquímica para NeuN; B, D e F – imuno-histoquímica para pGlur-1. Setas indicando células positivas para pGlur-1. Barra de calibração: 100 µm.

A ANOVA multivariada mostrou significância apenas para a variável pGlur-1 (F = 4,398, gl = 2, P < 0,05), porém ao realizar o pós-teste de Bonferroni nenhuma diferença significativa foi encontrada, não havendo, então, variação nessas quantificações entre os três grupos analisados. É possível que o pós-teste não tenha encontrado diferença significante em pGlur-1 entre GM e os demais grupos por conta do alto erro padrão (Figura 25). A ANOVA para os fatores NeuN e Razão não evidenciou significância (NeuN: F = 1,749, gl = 2, P > 0,05; Razão: F = 2,675, gl = 2, P > 0,05).





Legenda: Não há diferença significativa entre os grupos em nenhuma variável abordada (NeuN: GC 447,73 ± 28,39, GM 543,95 ± 66,28, GPF 435,66 ± 28,98; pGlur-1: GC 150,36 ± 48,07, GM 317,12 ± 67,49, GPF 130,51 ± 17,29; Razão: GC 0,33 ± 0,102, GM 0,57 ± 0,089, GPF 0,33 ± 0,055). P < 0,05

## 5 DISCUSSÃO

A nutrição é um importante fator para o desenvolvimento adequado do SNC, sendo o hipocampo uma estrutura particularmente sensível às alterações no aporte nutricional (CINTRA e cols., 1997; ANDRADE e cols., 1998; LISTER e cols., 2005). No presente estudo, avaliamos os efeitos da malnutrição proteica, administrada durante os 10 primeiros dias da lactação na nutriz, nos níveis de IRS1 e na distribuição de pGlur-1 (Ser 845) no hipocampo da prole de ratos Wistar em P10 e P60. Neste trabalho não observamos alterações quantitativas entre os grupos na primeira idade observada em relação ao grupo controle, ao fim das dietas administradas. Porém com o rato adulto, em P60, foi possível observar alterações. Os níveis de IRS1 no hipocampo estavam aumentados no GM. Neste mesmo grupo também foi possível encontrar um número maior de células positivas para pGlur-1 no CA3 desses animais, sem alterações no número total de neurônios.

Analisando a massa corporal da prole, demonstramos que os animais submetidos ao nosso modelo de restrição proteica possuem prejuízo no ganho de massa corporal em relação ao GC a partir de P4. Esse resultado está de acordo com o apresentado por Rocha (2016), com o mesmo modelo experimental. Um dos motivos para a redução da massa corporal na prole do GM é devido a menor ingestão alimentar da nutriz desse grupo. Logo após o desmame esses animais apresentaram *catch-up*, em P30. Porém, em P45 e P60 eles voltam a apresentar massa corporal reduzida em relação ao grupo controle, embora a significância seja reduzida e ainda menor no animal mais velho. Toyoshima e colaboradores (2004) mostraram que após a malnutrição proteica, esses animais possuem deficiência na utilização do ganho calórico para o crescimento. Estudos também demonstram que entre P30 e P90, o animal com malnutrição proteica apresenta alterações na homeostasia da glicose (MOURA e cols., 1996), desbalanço na secreção de insulina e glicocorticoides (BARJA-FIDALGO e cols., 2003), aumento na sensibilidade a insulina (SAMPAIO DE FREITAS e cols., 2003) aumento na resposta a leptina e inibição da apoptose nos timocitos (DA SILVA e cols., 2013).

Embora seja administrada uma dieta aproteica à nutriz, é importante ressaltar que a prole estudada não deixa de receber proteínas durante a amamentação. Em dados ainda não publicados, Lotufo (2012) analisou no nosso modelo os níveis de proteína, de lipídeos, de lactose e de calorias do leite da nutriz em P10 e P20 no GC e GM. Apenas em P10 foram encontradas diferenças e apenas nos níveis totais de proteína, onde o GM apresentou quantidade menor que o GC. Em P20 o leite não apresentou diferenças nesses parâmetros,

mostrando que ao normalizar a dieta, o leite da nutriz GM recupera suas propriedades nutricionais. Porém, não foi verificado quando essa normalização acontece. Também não se sabe se a quantidade de leite disponibilizada para a prole é alterada com a malnutrição proteica.

O GPF também apresenta curva de massa corporal reduzida nos dez primeiros dias de vida da prole, em relação ao GC, com padrão muito semelhante ao GM. Porém, os animais do GPF possuem massa corporal maior que o GM em P4, P6 e P8, demonstrando que nessa etapa do desenvolvimento a ausência de proteínas causa mais prejuízo ao desenvolvimento corporal do que a restrição calórica. Nas demais idades não foram encontradas diferenças na massa corporal entre GPF e GM. Em relação ao GC, o GPF tinha massa corporal inferior em P15 e P20, apresentando *catch-up* em P30 e com massa corporal reduzida em P45 e P60, embora a significância dessa diferença também seja reduzida no animal mais velho. O desenvolvimento da massa corporal dos animais GM e GPF é, portanto, muito semelhante. Esse resultado foi diferente do observado por Rocha e colaboradores (2014), onde o animal restrito caloricamente sempre apresentava massa corporal maior do que a prole da nutriz que recebeu dieta 0% proteína, a partir de P4 até P45. Em P60 o GM apresentava massa corporal maior em relação ao GPF e em P90 não foi encontrado nenhuma diferença entre os três grupos.

O grupo *pair-fed* foi estabelecido a partir de um estudo de Rocha e colaboradores (2014), em que 12g de ração comercial diária corresponderia à mesma ingestão calórica que o grupo malnutrido com 0% de proteína. Porém, os animais desse estudo, tanto do GC quanto do GM, apresentaram maior ingestão alimentar do que no estudo previamente citado. As nutrizes do GPF ingeriram significantemente menos ração e, portanto, tiveram menor ingestão calórica que as nutrizes do GM no primeiro dia de dieta e isso afetou a diferença total de ingestão entre os grupos. Essa diferença pode ter ocorrido devido a diferenças de sazonalidade, condições do biotério, estresse, entre outros. Com essa observação, não é possível afirmar que o GPF é isocalórico em relação ao GM. Embora ele ainda represente um modelo de restrição calórica, essa deficiência em particular é mais severa do que no GM, não podendo mais classificá-lo como um grupo de controle calórico. Isso pode justificar a diferença nos resultados das massas corporais ao longo do desenvolvimento observado nesse presente estudo e o publicado por Rocha e colaboradores (2014).

A privação materna a nutrientes durante a vida fetal e início da vida pós-natal está associada com atraso no crescimento, intolerância a glicose e diabetes na vida adulta (HALES e cols., 1991; POULSEN e cols., 1997). De fato, Hales e Barker (1992) propuseram que a malnutrição durante esse período pode resultar em prejuízos no desenvolvimento das células

 $\beta$ -pancreáticas, levando à deficiência de insulina na vida adulta. Isso é resultado de adaptações metabólicas sofridas pelo animal malnutrido que o beneficia a curto-prazo, porém a persistência dessas adaptações durante a vida leva a resistência a insulina (PHILLIPS, 1996). A malnutrição proteica materna durante a gestação com restrição de 50% já é suficiente para causar alterações na morfologia e composição celular das ilhotas pancreáticas nas fêmeas da prole (CALZADA e cols., 2016) e essas alterações são mantidas durante a vida pós-natal (CARVALHO e cols., 2006).

Sabe-se que a malnutrição proteica reduz a secreção de insulina induzida por glicose (OKITOLONDA e cols., 1987; REIS e cols., 1997; LEVINE e cols., 1983). Diversos estudos demonstraram que a malnutrição proteica estimula a supra-regulação da sinalização de insulina em diversos tecidos-alvo após injeção de insulina em doses farmacológicas (OKITOLONDA e cols., 1987; REIS e cols., 1997; LEVINE e cols., 1983; ESCRIVA e cols., 1991; PICAREL-BLANCHOT e cols., 1995; TOYOSHIMA e cols., 2004; TOYOSHIMA e cols., 2010; CRACE e cols., 1990). Latorraca e colaboradores (1998) demonstraram em um modelo de malnutrição protéica, 6% de proteína a partir do primeiro dia de gestação até P30, que os níveis de auto-fosforilação de IR e de IRS1 não eram diferentes aos do controle, embora tenham sido encontrados maiores níveis de fosforilação de IRS1 devido ao aumento da atividade da proteína quinase, no pâncreas. Toyoshima e colaboradores (2014) afirmam que cada tecido possui diferentes mecanismos para modular a sinalização da insulina e, por isso, a malnutrição proteica pode afetar de diferentes formas cada tecido. Em nosso modelo, a malnutrição proteica causou alterações no IRS1 no hipocampo de animais P60, com maiores níveis desse substrato, possivelmente causado por aumento compensatório na sinalização.

A literatura reporta que neurônios POMC (proopiomelanocortina), AgRP (proteína relacionada ao gene agouti) e NPY expressam maiores quantidades de IR (KONNER e cols., 2007; VARELA e cols., 2012; HILL e cols., 2010). Rocha (2016) observou níveis elevados de  $\alpha$ -MSH (hormônio alfa estimulante de melanócito), peptídeo derivado do POMC, no hipotálamo de animais adultos malnutridos submetidos ao mesmo modelo que o desse estudo. Com isso é possível sugerir que os neurônios do hipocampo e do hipotálamo possuam alterações semelhantes em nosso modelo, já que os níveis elevados de  $\alpha$ -MSH encontrados por Rocha (2016) podem ter ocorrido devido a aumento no número de neurônios POMC que, por apresentarem maiores quantidades de IR, também apresentariam aumento em IRS1. É importante ressaltar também que níveis elevados de  $\alpha$ -MSH estão relacionados a anorexia (BENOIT e cols., 2002), o que condiz com nossos resultados, uma vez que os animais do GM possuem massa corporal menor que os do GC.

Durante o aprendizado são observados no hipocampo níveis elevados de IR e maior sensibilidade a insulina (ZHAO e cols., 1999; DOU e cols., 2005). Entretanto, o papel do IR nos processos cognitivos ainda não foi completamente elucidado. Insuficiência de IR no organismo cursa com manifestações de problemas no aprendizado e na memória (NISTICÓ e cols., 2012), possivelmente devido a efeitos indiretos da insuficiência desse receptor (SALLAM e cols., 2015). Porém, em modelos com camundongos nocaute para IR neurônio-específico não foram observadas alterações na cognição desses animais (BRUNING e cols., 2000; SCHUBERT e cols., 2004). Ainda são necessários mais estudos para entender a importância e a função dessa molécula nesses processos.

Camundongos com sinalização do IR silenciada no hipocampo apresentaram redução da fosforilação da serina 845 do receptor Glur-1 e redução dos níveis do receptor GluN2B, ocasionando possíveis efeitos na LTP desses animais (GRILLO e cols., 2015). Esse resultado é condizente com o nosso, em que animais com 60 dias pós-natal apresentaram aumento de IRS1 no hipocampo e de Glur-1 fosforilado nessa serina no CA3. O nosso modelo não apresentou diferenças aos dez dias pós-natal, sugerindo que as dietas não produzem alterações em curto prazo no hipocampo, mas é capaz de programar a região, uma vez que o GM apresentou diferenças em P60.

A fosforilação de receptores AMPA está associada com aprendizado e alterações sinápticas. Além disso, camundongos com prevenção de fosforilação das serinas 845 e 831 do receptor Glur-1 apresentam menor rendimento no teste do labirinto aquático de Morris (OLIVITO e cols., 2016). Entretanto, há estudos que demonstram que não há alteração na capacidade de realizar esse teste por camundongos deficientes em Glur-1 (ZAMARILLO e cols., 1999) e outros que afirmam que o nocaute de Glur-1 diminui a capacidade da memória espacial de curto-prazo (SANDERSON e cols., 2009; SANDERSON e cols., 2010).

Embora o papel desse receptor na memória espacial ainda não seja claro, já foi elucidada a função das células piramidais do CA3 na memória espacial. Diversos estudos relacionam essa região do hipocampo com tarefas e localização espacial (O'KEEFE e DOSTROKY, 1971; DUPRET e cols., 2008; ZHANG e cols., 2008; GOLD e KESNER, 2005; KESER e WARTHEN, 2010; ROLLS e cols., 2013). Em um estudo anterior no nosso laboratório, com o mesmo modelo de malnutrição proteica, Lotufo (2012) reportou melhora no aprendizado e na memória de animais P90 ao observar diminuição no tempo de latência para encontrar a plataforma no primeiro dia do teste do labirinto aquático de Morris. Isso pode estar relacionado com o resultado encontrado nesse estudo, onde foi encontrado aumento na fosforilação da serina 845 do Glur-1 no CA3 desses animais. Além disso, o aumento dos

níveis de ISR1 observado nesse trabalho, também pode favorecer a sinalização de insulina e impactar na memória e aprendizado desses animais.

Entretanto, a literatura costuma reportar que a privação proteica durante o desenvolvimento causa diminuição das capacidades cognitivas (FUKUDA e cols., 2002; FUKUDA e cols., 2007; VALADARES e cols., 2005; CASTRO e cols., 1989, CORDOBA e cols., 1994; TONKISS e cols., 1990) ou nenhuma alteração na memória (TONKISS e GALLER, 1990; WOLF e cols., 1986; CAMPBELL e BEDI, 1989; BEDI, 1992). Essa discordância deve-se, possivelmente, a aplicação de modelos diferentes de malnutrição proteica. A fosforilação dos receptores AMPA não é o único processo envolvido no aprendizado e na memória. Existem, inclusive, evidências que demonstram que o excesso de receptores AMPA não é o suficiente para induzir a LTP (DAVIES e cols., 1983; KAUER e cols., 1988; MALENKA e cols., 1988; PERKEL e cols., 1993). Outras moléculas envolvidas no aprendizado e na memória podem estar relacionadas com os demais resultados apresentados na literatura.

Em P60 também foi possível observar certas alterações no padrão de imunomarcação de pGlur-1. No CA1 o GPF apresentou maior marcação nas células mais internas da camada piramidal do que nos outros grupos. No CA3 o GM e o GPF aparentam possuir menos marcação no *stratum radiatum* em relação ao GC. No giro denteado, o GC apresenta mais células positivas na camada sub-granular, onde estão presentes as células em cesto. Esse mesmo padrão não é visualizado nos grupos malnutrido e *pair-fed*. Isso demonstra que a alteração na dieta durante a lactação é capaz de alterar o padrão de imunomarcação de pGlur-1 no hipocampo.

Em relação ao número de neurônios, não foram observadas diferenças quantitativas em nenhuma região e em nenhuma das idades. Esse resultado está de acordo com o encontrado por Guedes (2015). Apesar disso, encontramos alterações qualitativas entre o GC e o GM no CA3, com maior desorganização e menor compactação da camada piramidal. Outros estudos corroboram com a vulnerabilidade do hipocampo às alterações da dieta. Cardoso e colaboradores (2013) observou, em um modelo de malnutrição com 8% de proteína durante seis meses, alteração na população de interneurônios parvalbumina positivos. Gonzalez (2015), ao administrar uma dieta hiperlipídica às nutrizes durante a gestação e lactação, observou aumento no número de neurônios no Corno de Ammon e GD em P10 e no CA1 e GD em P20, quando comparado com a dieta normolipídica. A não alteração no número de neurônios foi importante para constatar que a diferença no número de receptores pGlur-1 não foi devido a alteração neuronal. Porém, receptores AMPA funcionais também são expressos nos astrócitos hipocampais (FAN e cols. 1999; ZHOU e KIMELBERG, 2001), por exemplo, e não se sabe se essa alteração numérica está relacionada com a quantidade de células não-neuronais.

Dessa forma, foi possível observar que a restrição de proteínas durante a lactação afetou o desenvolvimento da massa corporal da prole, mas não causou impactos imediatos nas moléculas observadas no hipocampo, IRS1 e pGlur-1. Esses animais, porém, possivelmente sofreram programação metabólica, que levou a alteração no receptor de insulina, e consequentemente no aumento de seu substrato, no hipocampo. Uma vez que o IR modula a fosforilação do Glur-1 na serina 845, essa molécula fosforilada também se apresentou aumentada. É possível que o aumento de pGlur-1 no CA3 do hipocampo esteja relacionado com resultados, previamente encontrados por nosso grupo, de melhora na memória espacial e atividade exploratória.

# CONCLUSÕES

- a) Os animais submetidos ao modelo de malnutrição proteica 0% possuem menor massa corporal em relação ao grupo controle a partir de P4 até P60, com exceção de P30. Os animais *pair-fed* também apresentaram redução na massa corporal, de forma similar ao GM;
- b) Não houve alteração nos níveis de IRS1 no hipocampo em P10. Em P60 foi possível observar que o grupo malnutrido apresenta maior expressão desse substrato, possivelmente por programação metabólica;
- c) Não foi encontrado alteração no número de neurônios pGlur-1(Ser 845) positivos ou no padrão de distribuição de pGlur-1 (Ser 845) no hipocampo em P10. Assim como nos níveis de IRS1, foi encontrado aumento no número de neurônios pGlur-1 positivos em P60 no GM em relação ao GC. Essa alteração foi observada apenas no CA3 desses animais;
- d) Em P60 o GM e o GPF apresentaram alterações na distribuição de células pGlur-1 (Ser 845) positivos em relação ao grupo controle;
- e) Não foi observada alteração quantitativa de neurônios em nenhuma idade e região. Sendo assim, é possível inferir que a alteração na quantidade dos receptores estudados foi independente da quantidade neuronal. Entretanto, foi possível observar alterações qualitativas no CA3 do GM em P10, evidenciando a fragilidade do hipocampo a fatores externos.

# REFERÊNCIAS

Abbott, M. A.; Wells, D. G.; Fallon, J. R. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. J Neurosci. 1999; 19, 7300–7308

Afifi, A. K.; Bergman, R. A. Neuroanatomia Funcional – texto e atlas. 2a Edição. Ed. Roca Ltda., 2008.

Ahmadian, G.; Ju, W.; Liu, L.; Wyszynski, M.; Lee, S. H.; Dunah A. W.; Taghibiglou C.; Wang, Y.; Lu, J.; Wong, T.P.; Sheng, M.; Wang, Y.T. Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD. EMBO J. 2004 Mar 10; 23(5): 1040–1050.

Alamy, M.; Errami, M.; Taghzouti, K.; Saddiki-Traki, F.; Bengelloun, W. A. Effects of postweaning undernutrition on exploratory behavior, memory and sensory reactivity in rats: implication of the dopaminergic system. Physiol Behav. 2005; 86:195-202.

Alkon, D.L.; Nelson, T.J. Specificity of molecular changes in neurons involved in memory storage. FASEB J. 1990; 4:1567–76

Amaral, A.C.; Jakovcevski, M.; McGaughy, J.A.; Calderwood, S.K.; Mokler, D.J.; Rushmore, R.J.; Galler, J.R.; Akbarian, S.A.; Rosene, D.L. Prenatal protein malnutrition decreases KCNJ3 and 2DG activity in rat pré-frontal cortex. Neuroscience. 2015; Feb 12; 286:79-86

Andersen, P. et al. The Hippocampus Book. New York: Oxford University Press, 2007. Andrade, J. P.; Madeira, M.D.; Paula-Barbosa, M.M. Differential Vulnerability of the Subiculum and Entorhinal Cortex of the Adult Rat to Prolonged Protein Deprivation. Hippocampus. 1998; v. 8, p. 33–47.

Banke, T.G.; Bowie, D.; Lee, H.; Huganir, R.L.; Schousboe, A.; Traynelis, S.F. Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMPdependent protein kinase. J Neurosci. 2000; 20(1):89–102

Banks, W.A.; Jaspan, J.B.; Kastin, A.J. Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. Peptides. 1997; 18:1257e1262.

Banks, W.A.; Kastin, A.J. Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. Peptides. 1998; 19:883e889.

Banks, W.A.; Owen, J.B.; Erickson, M.A. Insulin in the brain: there and back again. Pharmacology & Therapeutics. 2012; 136:82e93.

Barbosa, A.C.B. Malnutrição durante a lactação e desenvolvimento hipocampal: Implicações sobre a proliferação celular e a expressão de vimentina. 2014. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) – Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
Barja-Fidalgo, C.; Souza, E.P.; Silva, S.V.; Rodrigues, A.L.; Anjos-Valotta, E.A.; Sannomyia, P.; DeFreitas, M.S.; Moura, A.S. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. Inflamm Res. 2003; Nov;52(11):470-6

Barria, A.; Derkach, V.; Soderling, T. Identification of the Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. J Biol Chem. 1997; 272(52):32727–32730 Bass, N. H.; Netsky, M. G; Young, E. Effects of neonatal malnutrition on developing cerebrum. I. Microchemical and histologic study of cellular differentiation in the rat. Arch Neurol. 1970; 23:289-302.

Beattie, E. C.; Carroll, R. C.; Yu, X.; Morishita, W.; Yasuda, H.; Zastrow, M.; von, Malenka, R. C. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. Nat Neurosci. 2000; 3, 1291–1300.

Bedi, K. S. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. J Comp Neurol. 1991; 311:425-433.

Bedi KS. Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. Physiol Behav. 1992; 51: 1001–1007

Bedinger, D. H.; Adams, S. H. Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissuespecific perspective for insulin receptor activators. Mol Cell Endocrinol. 2015; 415, 143–156.

Belluscio, L.M.; Berardino, B.G.; Ferroni, N.M.; Ceruti, J.M.; Cánepa, E.T. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. Physiol Behav. 2014; Apr 22;129:237-54

Benitez-Bribiesca, L.; De la Rosa-Alvarez, I.; Mansilla-Olivares, A. Dendritic spine pathology in infants with severe protein-calorie malnutrition. Pediatrics. 1999; 104:21.

Benito, M. Tissue-specificity of insulin action and resistance. Arch Physiol Biochem. 2011; 117:96-104.

Benke, T.A.; Luthi, A.; Isaac, J.T.; Collingridge, G.L. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. Nature. 1998; 393(6687):793–797.

Benoit, S.C.; Air, E.L.; Coolen, L.M.; Strauss, R.; Jackman, A.; Clegg, D.J.; Seeley, R.J.; Woods, S.C. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. The Journal of Neuroscience. 2002; 22:9048e9052.

Berardino, B.G.; Fesser, E.A.; Cánepa, E.T. Perinatal protein malnutrition alters expression of miRNA biogenesis genes Xpo5 and Ago2 in mice brain. Neurosci Lett. 2017; Apr 24; 647:38-44.

Biedermann, S. V.; Fuss, J.; Steinle, J.; Auer, M. K.; Dormann, C.; Falfán-Melgoza, C.; Ende, G.; Gass, P.; Weber-Fahr, W. The hippocampus and exercise: histological correlates of MR-detected volume changes. Brain Struct. Funct. 2016; 221, 1353–1363.

Birch, N.P.; Christie, D.L.; Renwick, A.G. Proinsulin-like material in mouse fetal brain cell cultures. FEBS Letters. 1984; 168:299e302.

Bliss, T.V.P.; Collingridge, G.L. Synaptic model of memory: longterm potentiation in the hippocampus. Nature. 1993; 361:31–39.

Bliss, T.V.; Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate área of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol. 1973 Jul;232(2):331-56.

Braveman, P; Marchi, K; Egerter, S; Kim, S; Metzler, M; Stancil, T; et al. Poverty, near-poverty, and hardship around the time of pregnancy. Matern Child Health J. 2010; 14(1):20–35.

Bruning, J. C.; Gautam, D.; Burks, D. J.; Gillette, J.; Schubert, M.; Orban, P. C.; Klein, R.; Krone, W.; Muller-Wieland, D.; Kahn, C. R. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science. 2000; 289, 2122–2125.

Born, J.; Lange, T.; Kern, W.; McGregor, G.P.; Bickel, U.; Fehm, H.L. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. Nat Neurosci. 2002; Jun;5(6):514-6.

Boyd, F. T.; Clarke, D. W.; Muther, T. F.; Raizada, M. K. Insulin receptors and insulin modulation of norepinephrine uptake in neuronal cultures from rat brain. J. Biol. Chem. 1985; 260, 15880–15884.

Calzada, L.; Morales, A.; Sosa-Larios, T.C.; Reyes-Castro, L.A.; Rodríguez-González, G.L.; Rodríguez-Mata, V.; Zambrano, E.; Morimoto, S. Maternal protein restriction during gestation impair female offspring pancreas development in the rat. Nutr Res. 2016; Aug:36(8): 855-62

Campbell LF, Bedi KS. The effects of undernutrition during early life on spatial learning. Physiol Behav. 1989; 45: 883–890

Caraiscos, V. B.; Bonin, R. P.; Newell, J. G.; Czerwinska, E.; Macdonald, J. F.; Orser, B. A. Insulin increases the potency of glycine at ionotropic glycine receptors. Mol Pharmacol. 2007; 71,1277–1287.

Cardoso, A.; Castro, J.P.; Pereira, P.A.; Andrade, J.P. Prolong protein deprivation, but not food restriction, affects parvalbumin-containing interneurons in the dentate gyrus of adult rats. Brain Res. 2013; Jul 19;1522:22-30.

Carneiro, E. M.; Mello, M.A.R.; Gobatto, C. A. & Boschero, A. C. Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and 45Ca uptake by pancreatic rat islets. J. Nutr. Biochem. 1995; 6: 314–318

Carvalho, C.P.; Martins, J.C.; da Cunha, D.A.; Boschero, A.C.; Collares-Buzato, C.B. Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islet tissue during in vivo maturation of rat pancreas. Ann Anat 2006; 188:221–34.

Castro, C.A.; Tracy, M.; Rudy, J.W. Early life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory processes mediating performance in a conditional-spatial discrimination task. Behav Brain Res. 1989; 32: 255–264

Chen, M.; Woods, S.C.; Porte, D. Jr. Effect of cerebral intravenricular insulin on pancreatic insulin secretion in the dog. Diabetes. 1975; Oct;24(10):910-4.

Chiu, S. L.; Chen, C. M.; Cline, H. T. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. Neuron. 2008; 58, 708–719.

Chiu, S.L.; Cline, H.T. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. Neural Dev. 2010 Mar 15;5:7.

Christie, J. M.; Wenthold, R. J.; Monaghan, D. T. Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. J. Neurochem. 1999; 72, 1523–1528.

Choi, J.; Li, C.; McDonald, T.J.; Comuzzie, A.; Mattern, V.; Nathanielsz, P.W. Emergence of insulin resistance in juvenile baboon offspring ofmothers exposed to moderate maternal nutrient reduction. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011; 301: R757–62.

Cintra, L.; Granados, L.; Aguilar, A.; Kemper, T.; DeBassio, W.; Galler, J.; Morgane, P.; Durán, P.; Díaz-Cintra, S. Effects of Prenatal Protein Malnutrition on Mossy Fibers of the Hippocampal formation in rats of four age groups. Hippocampus. 1997; v. 7, p. 184-191.

Clarke, D. W.; Boyd, F. T.; Kappy, M. S.; Raizada, M. K. Insulin binds to specific receptors and stimulates 2-deoxy-D-glucose uptake in cultured glial cells from rat brain. J. Biol. Chem. 1984; 259, 11672–11675.

Collingridge, G.L.; Isaac, J.T.; Wang, Y.T. Receptor trafficking and synaptic plasticity. Nat Rev Neurosci. 2004; 5:952-962.

Cordoba, N, E.; Arolfo, M.P.; Brioni, J.D.; Orsingher, O. A. Perinatal undernutrition impairs spatial learning in recovered adult rats. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam. 1994; 44: 70–76

Crace, C.J.; Swenne, I.; Kohn, P.G.; Strain, A.J.; Milner, R.D. Protein-energy malnutrition induces changes in insulin sensivity. Diabete Metab. 1990; 16:484-491.

Crain, B.; Cotman, C.; Taylor, D.; Lynch, G. A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. Brain Research. 1973; 63

Cravioto, J.; Arrieta, M. Efecto de la desnutricion sobre el desarrollo neurointegrativo del niño. Bol Méd Hosp Infant Mex. 1982; 39:708–724.

da Silva, S.V.; Salama, C.; Renovato-Martins, M.; Helal-Neto, E.; Citelli, M.; Savino, W.; Barja-Fidalgo, C. Increased leptin response and inhibition of apoptosis in thymocytes of young rats offspring from protein deprived dams during lactation. PLoS One. 2013; May 10;8(5): e64220.

Dahri, S.; Snoeck, A.; Reusens-Billen, B.; Remacle, C.; Hoet, J.J. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. Diabetes. 1991; 40 (Suppl 2): 115-20.

Danbolt, N.C. Glutamate uptake. Prog Neurobiol. 2001; 65, 1-105.

Danglot, L.; Triller, A.; Marty, S. The development of hippocampal interneurons in rodents. Hippocampus. 2006; 16(12):1032-60.

Davies, S.N.; Lester, R.A.; Reymann, K.G.; Collingridge, G.L. Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. Nature. 1989; 338(6215), 500–503

De Felice, F. G.; Vieira, M. N. N.; Bomfim, T. R.; Decker, H.; Velasco, P. T.; Lambert, M. P.; Viola, K. L.; Zhao, W. Q.; Ferreira, S. T.; Klein, W. L. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A $\beta$  oligomers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; May 5; 106(18): 7678.

De Felipe, J.; Marco, P.; Fairen, A.; Jones, E.G. Inhibitory synaptogenesis in mouse somatosensory cortex. Cerebral Cortex. 1997; 7:619–634.

de Oliveira, J.C.; Lisboa; P.C.; de Moura, E.G.; Barella, L.F.; Miranda, R.A.; Malta, A.; Franco, C.C.; Ribeiro, T.A.; Torrezan, R.; Gravena, C.; Mathias, P.C. Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. J Endocrinol. 2013; 216:195–206.

de Velasco, P.C.; Mendonça, H.R.; Borba, J.M.; Andrade da Costa, B.L.; Guedes, R.C.; Navarro, D.M.; Santos, G.K.; Faria-Melibeu, Ada, C.; Campello Costa, P.; Serfaty, C.A. Nutritional restriction of omega-3 fatty acids alters topographical fine tuning and leads to a delay in the critical period in the rodent visual system. Experimental Neurology. 2012; 234 220–229

Deidda, G.; Parrini, M.; Naskar, S.; Bozarth, I. F.; Contestabile, A.; Cancedda, L. Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. Nat. Med. 2015; 21, 318–326

Deng, W.; Aimone, J.B.; Gage, F.H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? Nat Rev Neurosci. 2010; 11:339–350.

Derkach, V.A.; Barria, A.; Soderling, T.R. Ca2+/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96, 3269-3274.

Derkach, V.A.; Oh, M.C.; Guire, E.S.; Soderling, T.R. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. Nat Rev Neurosci. 2007; 8:101–113

de Souza, A.S.; Fernandes, F.S.; Tavares do Carmo, M.G. Effects of maternal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on brain fatty acids, learning and memory. Nutr Rev. 2011; 69:132-144.

Des Robert, C.; Li, N.; Caicedo, R. Metabolic effects of different protein intakes after short term undernutrition in artificially reared infant rats. Early Hum Dev. 2009; 85:41-9.

Diáz-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. 1991; 310(3):356-64.

Dixon-Salazar, T. J.; Fourgeaud, L.; Tyler, C. M.; Poole, J. R.; Park, J. J.; Boulanger, L. M. MHC class I limits hippocampal synapse density by inhibiting neuronal insulin receptor signaling. J Neurosci. 2014; 34, 11844–11856.

Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S.F. The glutamate receptor ion channels. Pharmacol Rev. 1999; 51:7-61

Dorn, A., Bernstein, H.G., Rinne, A., Hahn, H.J., Ziegler, M. Insulin-like immunoreactivity in the human brain- a preliminary report. Histochemistry. 1982; 74:293e300.

Dorn, A.; Bernstein, H.G.; Rinne, A.; Ziegler, M.; Hahn, H.J.; Ansorge, S. Insulin- and glucagonlike peptides in the brain. Anatomical Record. 1983; 207:69e77.

Dou, J. T.; Chen, M.; Dufour, F.; Alkon, D. L.; Zhao, W. Q. Insulin receptor signaling in longterm memory consolidation following spatial learning. Learn. Mem. 2005; 12, 646–646.

Dudek, S.M.; Bear, M.F. Homosynaptic long-term depression in area ca1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89:4363-4367.

Dupret, D.; Revest, J.M.; Koehl, M.; Ichas, F.; De Giorgi, F.; Costet, P.; Abrous, D.N.; Piazza, P.V. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. PLoS One. 2008; 3: e1959.

Durand, G.M.; Kovalchuk, Y.; Konnerth, A. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing Hippocampus. Nature. 1996; 381:71–75.

Eccles, J.C. The Physiology of Synapses. New York: Academic Press. 1964; xi, 316 pp.

Ernst, A.; Alkass, K.; Bernard, S.; Salehpour, M.; Perl, S.; Tisdale, J.; Possnert, G.; Druid, H.; Frisen, J. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. Cell. 2014; 156:1072–1083.

Escriva, F.; Kergoat, M.; Bailbe, D.; Pascual-Leone, A.M.; Portha, B. Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. Diabetologia. 1991; 34:559-564.

Fan, D.; Grooms, S.Y.; Araneda, R.C.; Johnson, A.B.; Dobrenis, K.; Kessler, J.A.; Zukin, R.S. AMPA receptor protein expression and function in astrocytes cultured from hippocampus. Journal of Neuroscience Research. 1999; 57:557–571.

Flood, D.G. Critical issues in the analysis of dendritic extend in aging humans, primates, and rodents. Neurobiol Aging. 1993; 14:649-654.

Florian, M. L.; Nunes, M. L. Effects of intra-uterine and early extra-uterine malnutrition on seizure threshold and hippocampal morphometry of pup rats. Nutr Neurosci. 2010; 13:265-273.

Fritsche, L.; Weigert, C.; Haring, H.U.; Lehmann, R. How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver--implications for health and disease. Curr Med Chem. 2008. 15:1316-1329

Fritschy, J. M.; Weinmann, O.; Wenzel, A.; Benke, D. Synapse-specific localization of NMDA and GABA (A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. J Comp Neurol. 1998; 390:194-210.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Acessado em 06/03/2017 <a href="http://www.fao.org/hunger/en/">http://www.fao.org/hunger/en/</a>

Fukuda, M.T.H.; Françolin-Silva, A.L.; Almeida, S.S. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. Behav Brain Res. 2002; 133: 271–277.

Fukuda, M.T.H.; Françolin-Silva, A.L.; Hernandes, A.S.; Valadares, C.T.; Almeida, S.S. Effects of early protein malnutrition and scopolamine on learning and memory in the Morris water maze. Nutr Neurosci. 2007; 10: 251–259

Garofano, A.; Czernichow, P.; Bréant, B. Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. Diabetologia. 1998; 41:1114–20.

Geinisman, Y.; de Toledo-Morrell, L.; Morrell, F.; Persina, I.S.; Rossi, M. Age-related loss of axospinous synapses formed by two afferent systems in the rat dentate gyrus as revealed by the unbiased stereological dissector technique. Hippocampus. 1992; 2:437–444.

Georgieff, M. K. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. Am J Clin Nutr. 2007; Feb; 85(2):614S-620S.

Ghasemi, R., Haeri, A., Dargahi, L., Mohamed, Z., Ahmadiani, A., 2013. Insulin in the brain: sources, localization and functions. Molecular Neurobiology. 47:145e171.

Ghersi, M.S.; Gabach, L.A.; Buteler, F.; Vilcaes, A.A.; Schiöth, H.B.; Perez, M.F.; de Barioglio, S.R. Ghrelin increases memory consolidation through hippocampal mechanisms dependent on glutamate release and NR2B-subunits of the NMDA receptor. Psychopharmacology (Berl). 2015; May;232(10):1843-57.

Gluckman, P.D.; Hanson, M.A. The developmental origins of the metabolic syndrome. Trends Endocrinol Metab. 2004.15: 183–187.

Gray, S. M.; Meijer, R. I.; Barrett, E. J. Insulin regulates brain function, but how does it get there? Diabetes. 2014; 63, 3992–3997

Grillo, C. A.; Piroli, G. G.; Lawrence, R. C.; Wrighten, S. A.; Green, A. J.; Wilson, S. P.; Sakai, R. R; Kelly, S. J.; Wilson, M. A.; Mott, D. D.; Reagan, L. P. Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity. Diabetes. 2015; 64, 3927–3936.

Gold, A.E.; Kesner, R.P. The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. Hippocampus. 2005; 15:808–814

Gonzales, G. P. L. A alimentação com dieta hiperlipídica, contendo óleo de soja, durante a gestação e a lactação, influencia a composição corporal e o desenvolvimento do hipocampo da prole de ratos Wistar. 2015. 137 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

González, E.M.; Penedo, L.A.; Oliveira-Silva, P.; Campello-Costa, P.; Guedes, R.C.; Serfaty, C.A. Neonatal tryptophan dietary restriction alters development of retinotectal projections in rats. Experimental Neurology. 2008; 211 441-448

Govindarajan, A.; Israely, I.; Huang, S.-Y.; Tonegawa, S. The dendritic branch is the preferred integrative unit for protein synthesis-dependent LTP. Neuron. 2011; 69, 132–146.

Greengard, P.; Jen, J.; Nairn, A.C.; Stevens, C.F. Enhancement of the glutamate response by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. Science. 1991; 253,1135-1138.

Guedes, P.L. Redução dos neurônios neuropeptidérgicos no hipocampo de ratos no início da vida pós-natal em um modelo de malnutrição. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Hales, C. N.; Barker, D.J.P.; Clark, P.M.S.; Cox, L. J.; Fall, C.; Osmond, C.; Winter, P. D. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. Br. Med. 1991; J. 303: 1019–1022.

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

Hales, C. N.; Barker, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. Br Med Bull. 2001;60:5-20. Han, P.; Whelan, P.J. Modulation of AMPA currents by D1-like but not D2-like receptors in spinal motoneurons. Neurosci. 2009; 158, 1699-1707.

Hanson, M.A.; Gluckman, P.D. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? Physiol Rev. 2014; 94:1027–76.

Hawes, J.E.; Tesic, D.; Whitehouse, A.J.; Zosky, G.R.; Smith, J.T.; Wyrwoll, C.S. Maternal vitamin D deficiency alters fetal brain development in the BALB/c mouse. Behav Brain Res. 2015 Jun 1;286:192-200

Hayashi, Y.; Shi, S.H.; Esteban, J.A.; Piccini, A.; Poncer, J.C.; Malinow, R. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. Science. 2000; 287(5461):2262–2267

Hebb, D. The Organization of Behavior. New York: Wiley. 1949 Hernandes, A. S. and Almeida, S. S. Postnatal protein malnutrition affects inhibitory avoidance and risk assessment behaviors in two models of anxiety in rats. Nutr Neurosci. 2003; 6: 213-219. Heni, M.; Kullmann, S.; Ketterer, C.; Guthoff, M.; Linder, K.; Wagner, R.; Stingl, K.T.; Veit, R.; Staiger, H.; Häring, H.U.; Preissl, H.; Fritsche, A. Nasal insulin changes peripheral insulin sensitivity simultaneously with altered activity in homeostatic and reward-related human brain regions. Diabetologia. 2012; Jun;55(6):1773-82.

Henley, J.M.; Wilkinson, K.A. AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. Dialogues Clin Neurosci. 2013; 2013 Mar; 15(1):11-27

Heynen, A.J.; Quinlan, E.M.; Bae, D.C.; Bear, M.F. Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. Neuron. 2000; 28:527–36

Hill, J.W.; Elias, C.F.; Fukuda, M.; Williams, K.W.; Berglund, E.D.; Holland, W.L.; Cho, Y.R.; Chuang, J.C.; Xu, Y.; Choi, M.; Lauzon, D.; Lee, C.E.; Coppari, R.; Richardson, J.A.; Zigman, J.M.; Chua, S.; Scherer, P.E.; Lowell, B.B.; Brüning, J.C.; Elmquist, J.K. Direct insulin and leptin action on proopiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. Cell Metabolism. 2010; 11:286e297.

Hollmann, M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. Annu. Rev. Neurosci. 17:31–108

Huang, C. C.; You, J. L.; Lee, C. C.; Hsu, K. S. Insulin induces a novel form of postsynaptic mossy fiber long-term depression in the hippocampus. Mol Cell Endocrinol. 2003; 24, 831–841.

Isaac, J.T.; Crair, M.C.; Nicoll, R.A.; Malenka, R.C. Silent synapses during development of thalamocortical inputs. Neuron. 1997; 18:269–80

Izquierdo, I. Memória. 2a Editon. Ed. Artmed, Porto Alegre. 2011; 48-50.

Jones, D. G.; Dyson, S. E. The influence of protein restriction, rehabilitation and changing nutritional status on synaptic development: a quantitative study in rat brain. Brain Res. 1981; 208:97-111.

Kanai, Y.; Hediger, M.A. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. Eur J Pharmacol. 2003; 479, 237-47.

Kandel, E.R. Genes, synapses, and longterm memory. J. Cell. Physiol. 173:124-25. 1997.

Kandel, E.R.; Scwartz, J.H.; Jessel, T.M. Principales of neural Science. McGraw Hill, London. 2000; 1230-1260.

Kauer, J.A.; Malenka, R.C.; Nicoll, R.A. A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. Neuron. 1988; 1(10), 911–917

Kempermann, G.; Gast, D.; Gage, F.H. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogeneses by long-term enivronmental enrichment. Ann Neurol. 2002; Aug;52(2):135-43.

Kempermann, G.; Kuhn, H.G.; Gage, F.H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. J Neurosci. 1998; 18:3206–3212.

Kesner, R.P.; Warthen, D.K. Implications of CA3 NMDA and opiate receptors for spatial pattern completion in rats. Hippocampus. 2010; 20:550–557.

Kleinridders, A.; Cai, W.; Cappellucci, L.; Ghazarian, A.; Collins, W. R.; Vienberg, S. G.; Pothos, E. N.; Kahn, C. R. Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. Proc. Natl. Acad. Sci. 2015; 112, 3463–3468.

Könner, A. C.; Hess, S.; Tovar, S.; Mesaros, A.; Sánchez-Lasheras, C.; Evers, N.; Verhagen, L. A. W.; Brönneke, H.S.; Kleinridders, A.; Hampel, B.; Kloppenburg, P.; Brüning, J.C. Role for Insulin Signaling in Catecholaminergic Neurons in Control of Energy Homeostasis. Cell Metab. 2011; 13, 720–728.

Könner, A.C.; Janoschek, R.; Plum, L.; Jordan, S.D.; Rother, E.; Ma, X., Xu, C.; Enriori, P.; Hampel, B.; Barsh, G.S.; Kahn, C.R.; Cowley, M.A.; Ashcroft, F.M.; Brüning, J.C Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. Cell Metabolism. 2007; 5:438e449.

Kuhn, H.G.; Dickinson-Anson, H.; Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J Neurosci. 1996; 16:2027–2033.

Latorraca, M.Q.; Reis, M.A.; Carneiro, E.M.; Mello, M.A.; Velloso, L.A.; Saad, M.J.; Boschero, A.C. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. J Nutr. 1998; Oct, 128(10):1643-9

Liao, D.; Malinow, R. Deficiency in induction but not expression of LTP in hippocampal slices from young rats. Learn. Mem. 1996; 3:138–49

Liao, D.; Hessler, N.A.; Malinow, R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. Nature. 1995; 375:400–404.

Lima, S. S.; Lima dos Santos, M. C.; Sinder, M. P.; Moura, A. S.; Barradas, P. C.; Tenorio, F.; Glycogen stores are impaired in hypothalamic nuclei of rats malnourished during early life. Nutr Neurosci. 2010; 13: 21-28.

Lin, J. W.; Ju, W.; Foster, K.; Lee, S.H.; Ahmadian, G.; Wyszynski, M.; Wang, Y.T.; Sheng, M. Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. Nat. Neurosci. 2000; 3, 1282–1290

Linden, D.J. Long-term synaptic depression in the mammalian brain. Neuron. 1994; 12:457–472.

Lipton, S.A.; Rosenberg, P.A. Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. N Engl J Med. 1994; 330:613–622.

Lister, J. P.; Blatt, G.J.; DeBassio, W.A.; Kemper, T.L.; Tonkiss, J.; Galler, J.R.; Rosene, D.L. Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. Hippocampus. 2005; v. 15, p. 393-403.

Liu, L.; Brown, J. C.; Webster, W. W.; Morrisett, R. A.; Monaghan, D. T. Insulin potentiates Nmethyl-D-aspartate receptor activity in Xenopus oocytes and rat hippocampus. Neurosci.Lett. 1995; 192, 5–8.

Lee, C. C.; Huang, C. C.; Wu, M. Y.; Hsu, K. S. Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. J Biol Chem. 2005; 280, 18543–18550.

Lee, C. C; Huang, C. C.; Hsu, K. S. Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. Neuropharmacology. 2011; 61, 867–879.

Levine, L.S.; Wright, P.G.; Marcus, F. Failure to secrete immunoreactive insulin by rats fed a low protein diet. Acta Endocrinol (Copenh). 1983; 102:240-245.

Lotufo, B. Malnutrição protéica e desenvolvimento hipocampal: estudo das implicações sobre memória/aprendizado e avaliação da distribuição da Óxido Nítrico Sintase. 2012. 102. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Lu, W.; Shi, Y.; Jackson, A.C.; Bjorgan, K.; During, M.J.; Sprengel, R.; Seeburg, P.H.; Nicoll, R.A. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. Neuron. 2009; 62, 254–268.

Lucas, A. Programmin by early nutrition in man. Ciba Found Symp. 1991; 156:38-50; discussion 50-5.

Lukoyanov, N. V.; Andrade, J. P. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. Behav Brain Res. 2000; 112: 85-97.

Lüscher, C.; Xia, H.; Beattie, E.C.; Carroll, R.C.; von Zastrow, M.; Malenka, R.C.; Nicoll, R.A. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. Neuron. 1999; 24(3), 649–658.

Malenka, R.C.; Kauer, J.A.; Zucker, R.S.; Nicoll, R.A. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. Science. 1988; 242(4875), 81–84

Malinow, R.; Malenka, R.C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. Annu Rev Neurosci. 2002; 25:103-126.

Maloney, B.; Sambamurti, K.; Zawia, N.; Lahiri D.K. Applying epigenetics to lzheimer's disease via the latent early-life associated regulation (LEARn) model. Curr Alzheimer Res. 2012; 9:589–99.

Man, H. Y.; Lin, J. W.; Ju, W. H.; Ahmadian, G.; Liu, L.; Becker, L. E.; Sheng, M.; Wang, Y. T. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. Neuron. 2000; 25, 649–662.

Marcelino, A.A.; Moura, A.S.; Barradas, P.C.; Tenorio, F. Hypothalamic nuclei nitric oxide synthase expression in rats malnourished during early lactation period. Nutr Neurosci. 2004; 7:177–184.

Mark, L.P.; Prost, R.W.; Ulmer, J.L.; Smith, M.M.; Daniels, D.L.; Strottmann, J.M.; Brown, W.D.; Hacein-Bey, L. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. AJNR Am J Neuroradiol. 2001; 22, 1813-24.

Marks, J. L.; Maddison, J.; Eastman, C. J. Subcellular localization of rat brain insulin binding sites. J. Neurochem. 1988; 50, 774–781.

Martín, E.D.; Sánchez-Perez, A.; Trejo, J.L.; Martin-Aldana, J.A.; Cano Jaimez, M.; Pons, S.; Acosta Umanzor, C.; Menes, L.; White, M.F.; Burks, D.J. IRS-2 deficiency impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation. Cereb Cortex. 2012; 22:1717–1727

Micheva, K.D.; Beaulieu, C. Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. Journal of Comparative Neurology. 1996; 373:340–354.

Mielke, J.G.; Taghibiglou, C.; Liu, L.; Zhang, Y.; Jia, Z.; Adeli, K.; Wang, Y.T. A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance. J Neurochem. 2005; Jun;93(6):1568-78

Montanha-Rojas, E. A.; Ferreira, A. A.; Tenorio, F.; Barradas, P. C. Myelin basic protein accumulation is impaired in a model of protein deficiency during development. Nutr Neurosci. 2005; 8: 49-56.

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. 1993; 17:91-128.

Morgane, P. J.; Mokler, D. J.; Galler, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. Neurosci Biobehav Rev. 2002; 26:471-483.

Morimoto, S.; Sosa, T.C.; Calzada, L.; Reyes-Castro, L.A.; Díaz-Díaz, E.; Morales, A.; Nathanielsz, P.W.; Zambrano, E. Developmental programming of aging of isolated pancreatic islet glucose-stimulated insulin secretion in female offspring of mothers fed low-protein diets in pregnancy and/or lactation. J Dev Orig Health Dis. 2012; 3:483–8.

Morris, R.G.M.; Anderson, E.; Lynch, G.S.; Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of LTP by NMDA receptor antagonist, AP5. Nature. 1986; 319:774-776.

Moura, A.S.; Carpinelli, A.R.; Barbosa, F.B.; Gravena, C.; Mathias, P.C. Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1996; Apr; 92(1):73-84.

Nabavi, S.; Fox, R.; Proulx, C. D.; Lin, J. Y.; Tsien, R. Y.; Malinow, R. Engineering a memory with LTD and LTP. Nature. 2014; 511, 348–352

Naik, A.A.; Patro, I.K.; Patro, N. Slow physical growth, delayed reflex ontogeny, and permanente behavioral as well as cognitive impairments in rats following intra-generational protein malnutrition. Front Neurosci. 2015 Dec 8;9:446.

Newcomb, R.; Sun, X.; Taylor, L.; Curthoys, N.; Giffard, R.G. Increased production of extracellular glutamate by the mitochondrial glutaminase following neuronal death. J Biol Chem. 1997; 272, 11276-82.

Nishijima, M. Somatomedin-C as a fetal growth promoting factor and amino acid composition of cord blood in Japanese neonates. J Perinat Med. 1986; 14(3):163–169.

Nisticó, R.; Cavallucci, V.; Piccinin, S.; Macrí, S.; Pignatelli, M.; Mehdawy, B.; Blandini, F.; Laviola, G.; Lauro, D.; Mercuri, N.B.; D'Amelio, M. Insulin receptor β-subunit haploinsufficiency impairs hippocampal late-phase ltp and recognition memory. Neuro Molecular Med. 2012; 14, 262–269.

Nusser, Z.; Lujan, R.; Laube, G.; Roberts, J.D.; Molnar, E.; Somogyi, P. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. Neuron. 1998; 21:545–59.

Obici, S.; Zhang, B.B.; Karkanias, G.; Rossetti, L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. Nat Med. 2002; Dec;8(12):1376-82

O'Keefe, J.; Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. Brain Res. 1971; 34:171–175.

O'Keefe, J; Nadel, L. The Hippocampus as a Cognitive Map. Oxford University Press. 103-140, 1978.

Okitolonda, W.; Brichard, S.M.; Henquin, J.C. Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. Diabetologia. 1987; 30:946-951.

Olivito, L.; Saccone, P.; Perri, V.; Bachman, J.L.; Fragapane, P.; Mele, A.; Huganir, R.L.; De Leonibus, E. Phosphotylation of the AMPA receptor GluA1 subunit regulates memory load capacity. Brain Struct Funct. 2016; Jan;221(1): 591-603

O'Malley, D.; Shanley, L. J.; Harvey, J. Insulin inhibits rat hippocampal neurones via activation of ATP-sensitive K+ and large conductance Ca2+-activated K+ channels. Neuropharmacology. 2003; 44, 855–863.

Oh, M.C.; Derkach, V.A.; Guire, E.S.; Soderling, T.R. Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. J Biol Chem. 2006; 281:752–758

Ong, T.P.; Ozanne, S.E. Developmental programming of type 2 diabetes: early nutrition and epigenetic mechanisms. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2015; 18:354–60.

Ozanne, S.E.; Constância, M. Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2007; 3:539–46.

Palmer, C.L., Cotton, L., and Henley, J.M. The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. Pharmacol. Rev. 2005; 57, 253–277.

Passafaro, M.; Piëch, V.; Sheng, M. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. Nat Neurosci. 2001; 4, 917–926.

Passos, P.P.; Borba, J.M.; Rocha-de-Melo, A.P.; Guedes, R.C.; da Silva, R.P.; Filho, W.T.; Gouveia, K.M.; Navarro, D.M.; Santos, G.K.; Borner, R.; Picanço-Diniz, C.W.; Pereira, A Jr.; de Oliveira Costa, M.S.; Rodrigues, M.C.; Andrade-da-Costa, B.L. Dopaminergic cell populations of the rat substantia nigra are differentially affected by essential fatty acid dietary restriction over two generations. Journal of Chemical Neuroanatomy. 2012; 44 66–75

Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain – In stereotaxic coordinates. 4a Edição. Academic Press, USA. 1998.

Penedo, L.A.; Oliveira-Silva, P.; Gonzalez, E.M.; Maciel, R.; Jurgilas, P.B.; Melibeu Ada, C.; Campello-Costa, P.; Serfaty, C.A. Nutritional tryptophan restriction impairs plasticity of retinotectal axons during the critical period. Experimental Neurology. 2009; 217 108–115

Perkel, D.J.; Petrozzino, J.J.; Nicoll, R.A.; Connor, J.A. The role of Ca2b entry via synaptically activated NMDA receptors in the induction of long-term potentiation, Neuron. 1993; 11(5), 817–823.

Petralia, R.S.; Esteban, J.A.; Wang, Y.X.; Partridge, J.G.; Zhao, H.M.; Wenthold, R.J.; Malinow, R.. Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silente synapses. Nat. Neurosci. 1999; 2:31–36

Phillips, D.I.W. Insulin resistance as a programmed response to fetal undernutrition. Diabetologia. 1996; 39: 1119–1122.

Picarel-Blanchot, F.; Alvarez, C.; Bailbe, D.; Pascual-Leone, A.M.; Portha, B. Changes in insulin action and insulin secretion in the rat after dietary restriction early in life: influence of food restriction versus low-protein food restriction. Metabolism. 1995; 44:1519-1526.

Pigott, B.M.; Garthwaite, J. Nitric Oxide Is Required for L-Type Ca(2+) Channel-Dependent Long-Term Potentiation in the Hippocampus. Front Synaptic Neurosci. 2016; Jun 29;8:17.

Piskorowski, R. A.; Chevaleyre, V. Synaptic integration by different dendritic compartments of hippocampal CA1 and CA2 pyramidal neurons. Cell. Mol. Life Sci. 2012; 69:75–88

Plum, L.; Schubert, M.; Bruning, J.C. The role of insulin receptor signaling in the brain. Trends in Endocrinology and Metabolism. 2005; 16:59e65.

Pontes, A.H.; de Sousa, M.V. Mass Spectrometry-Based Approaches to Understand the Molecular Basis of Memory. Front. Chem. 2016; 4:40.

Poulsen, P.; Vaag, A. A.; Kyvik, K. O.; Møller Jensen, D.; Beck-Nielsen, H. Low birth weight is associated with NIDDM in discordant monozygotic and dizygotic twin pairs. Diabetologia. 1997; 40: 439–446.

Pratchayasakul, W.; Kerdphoo, S.; Petsophonsakul, P.; Pongchaidecha, A.; Chattipakorn, N.; Chattipakorn, S. Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone. Life Sci. 2011; Mar 28;88(13-14):619-27.

Ranade, S. C.; Rose, A.; Rao, M.; Gallego, J.; Gressens, P.; Mani, S. Different types of nutritional deficiencies affect different domains of spatial memory function checked in a radial arm maze. J Neurosc. 2008; 152: 859–866.

Reger, M.A.; Watson, G.S.; Frey 2nd, W.H.; Baker, L.D.; Cholerton, B.; Keeling, M.L.; Belongia, D.A.; Fishel, M.A.; Plymate, S.R.; Schellenberg, G.D.; Cherrier, M.M.; Craft, S. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. Neurobiology of Aging. 2006; 27:451e458.

Reis, M.A.B.; Carneiro, E. M.; Mello, M.A.R.; Boschero, A. C.; Saad, M.J.A.; Velloso, L. A. Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor. J Nutr. 1997; Mar;127(3):403-10.

Reusens, B.; Remacle, C. Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. Int J Biochem Cell Biol. 2006; 38:913–22.

Rhodes, P.; Craigon, J.; Gray, C.; Rhind, S.M.; Loughna, P.T.; Gardner, D.S. Adult-onset obesity reveals prenatal programming of glucose-insulin sensitivity in male sheep nutrient restricted during late gestation. PLoS One. 2009; 4:e7393.

Ribeiro, C. R. S. Efeitos da desnutrição protéica durante o período de lactação sobre a função tireóidea de ratas lactantes e seus filhotes. Dissertação de Doutorado em Biologia. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 1997.

Rice, D.; Barone, S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. Environment Health Perspective. 2000; 108:511–533.

Rocha, M. L. M. A malnutrição proteica materna durante a lactação altera o desenvolvimento e o padrão de distribuição de moléculas anorexigênicas em núcleos hipotalâmicos de ratos machos. 2016. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Rocha, M.L.; Fernandes, P.P.; Lotufo, B.M.; Manhães, A.C.; Barradas, P.C.; Tenorio, F. Undernutrition during early life alters neuropeptide Y distribution along the arcuate/paraventricular pathway. Neuroscience. 2014 Jan 3;256: 379-91.

Rolls, E.T. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. Front Syst Neurosci. 2013; 7:74.

Roseboom, T.J.; van der Meulen, J.H.; Osmond, C.; Barker, D.J.; Ravelli, A.C.; Schroeder-Tanka, J.M., van Montfrans, G.A.; Michels, R.P.; Bleker, O.P. Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944–45. Heart. 2000; 84:595–98.

Rotta, L. N.; Schmidt, A. P.; Mello e Souza, T.; Nogueira, C. W.; Souza, K. B.; Izquierdo, I. A.; Perry, M. L.; Souza, D. O. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. Neurochem Res. 2003; 28:1181-1186.

Rumpel, S.; Hatt, H.; Gottmann, K. Silent synapses in the developing rat visual cortex: evidence for postsynaptic expression. of synaptic plasticity. J. Neurosci. 1998; 18:8863–74

Sallam, H. S.; Tumurbaatar, B.; Zhang, W.-R.; Tuvdendorj, D.; Chandalia, M.; Tempia, F.; Laezza, F.; Taglialatela, G.; Abate, N. Peripheral adipose tissue insulin resistance alters lipid composition and function of hippocampal synapses. J. Neurochem. 2015; 125–133.

Saltiel, A.R.; Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001; 414:799–806.

Sampaio de Freitas, M.; Garcia De Souza, E.P.; Vargas da Silva, S.; da Rocha Kaezer, A. da Silva Vieira, R.; Sanchez Moura, A.; Barja-Fidalgo, C. Up-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to maternal undernutrition. Biochim Biophys Acta. 2003; Sep 1;1639(1):8-16.

Samuel, V.T.; Shulman, G.I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. Cell. 2012; 148:852e871.

Sanderson, D.J.; Good, M.A.; Skelton, K.; Sprengel, R.; Seeburg, P.H.; Rawlins, J.N.; Bannerman, D.M. Enhanced long-term and impaired short-term spatial memory in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice: evidence for a dual-process memory model. Learn Mem. 2009; 16(6):379–386.

Sanderson, D.J.; McHugh, S.B.; Good, M.A.; Sprengel, R.; Seeburg, P.H.; Rawlins, J.N.; Bannerman, D.M. Spatial working memory deficits in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice reflect impaired short-term habituation: evidence for Wagner's dualprocess memory model. Neuropsychologia. 2010; 48(8):2303–2315.

Sauter A., Goldstein M., Engel J., Ueta K. Effect of insulin on central catecholamines. Brain Res. 1983; 260, 330–333.

Schoenrock, S.A.; Tarantino, L.M. Developmental vitamin D deficiency and schizophrenia: the role of animal models. Genes Brain Behav. 2016; Jan;15(1):45-61.

Schubert, M.; Gautam, D.; Surjo, D.; Ueki, K.; Baudler, S.; Schubert, D.; Kondo, T.; Alber, J.; Galldiks, N.; Küstermann, E.; Arndt, S.; Jacobs, A.H.; Krone, W.; Kahn, C.R. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. Proc Nat Acad Sci USA. 2004; 101, 3100–5.

Schwartz, M.W.; Figlewicz, D.P.; Baskin, D.G.; Woods, S.C.; Porte, D Jr. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. Endocr Rev. 1992; 13:387-414.

Schwartz, M.W.; Porte Jr., D. Diabetes, obesity, and the brain. Science. 2005; 307:375e379.

Semple, B.D.; Blomgren, K.; Gimlin, K.; Ferriero, D.M.; Noble-Haeusslein, L.J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. Prog Neurobiol. 2013; Jul-Aug;106-107:1-16

Seki, T.; Arai, Y. Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. Neuroreport. 1995; 6:2479–2482.

Sherwood, N.; Timiras, P.S. A Stereotaxic Atlas of the Developing Rat Brain. 1970. Skeberdis, V. A.; Lan, J.; Zheng, X.; Zukin, R. S.; Bennett, M. V. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. Proc Nat Acad Sci USA. 2001; 98, 3561–3566.

Stockhorst, U.; de Fries, D.; Steingrueber, H.J.; Scherbaum, W.A. Unconditioned and conditioned effects of intranaally administered insulin vs placebo in healthy men: a randomised controlled trial. Diabetologia. 2011; Jun;54(6):1502-6.

Takumi, Y.; Ramírez -Léon, V.; Laake, P.; Rinvik, E.; Ottersen, O.P. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. Nat. Neurosci. 1999; 2:618–24

Thirone, A.C.; Huang, C.; Klip, A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. Trends Endocrinol Metab. 2006; 17:72-78.

Todd, S.E.; Oliver, M.H.; Jaquiery, A.L.; Bloomfield, F.H.; Harding, J.E. Periconceptional undernutrition of ewes impairs glucose tolerance in their adult offspring. Pediatr Res. 2009; 65:409–13.

Tole, S.; Christian, C.; Grove, E.A. Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse hippocampus. Development. 1997; Dec;124(24):4959-70.

Tonkiss, J.; Galler, J.R.; Formica, R.N.; Shukitt-Hale, B.; Timm, R.R. Fetal protein malnutrition impairs acquisition of a DRL task in adult rats. Physiol Behav. 1990; 48: 73–77 Tonkiss J, Galler JR. Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adultsrats. Behav Brain Res. 1990; 40: 95–107.

Toni, N.; Schinder, A. F. Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015; Dec 4;8(1): a018903.

Toyoshima, Y.; Ohne, Y.; Takahashi, S.I.; Noguchi, T.; Kato, H. Dietary protein deprivation decreases the serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in rat skeletal muscle. J Mol Endocrinol. 2004; 32:519-531.

Toyoshima, Y.; Tokita, R.; Ohne, Y.; Hakuno, F.; Noguchi, T.; Minami, S.; Kato, H.; Takahashi, S. Dietary protein deprivation upregulates insulin signaling and inhibits gluconeogenesis in rat liver. J Mol Endocrinol. 2010; 45:329-340.

Toyoshima, Y.; Tokita, R.; Taguchi, Y.; Akiyama-Akanishi, N.; Takenaka, A.; Kato, H.; Chida, K.; Hakuno, F.; Minami, S.; Takahashi, S. Tissue specific effects of protein malnutrition on insulin signaling pathway and lipid accumulation in growing rats. Endocr J. 2014; 61(5):499-512.

Traynelis, S. F.; Wollmuth, L.P.; McBain, C.J.; Menniti, F.S.; Vance, K.M.; Ogden, K.K.; Hansen, K.B.; Yuan, H. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation and function. Pharmacol Rev. 2010; 62, 405–496 (2010)

Tropepe, V.; Craig, C.G.; Morshead, C.M.; van der Kooy, D. Transforming growth factoralpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. J Neurosci. 1997; 17:7850–7859.

Valadares, C.T.; Almeida, S.S. Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water maze. Nutr Neurosci. 2005; 8: 39–47.

Valadares C.T.; Fukuda, M. T.; Françolin-Silva, A. L.; Hernandes, A. S., Almeida, S. S. van Praag, H.; Kempermann, G.; Gage, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat. Neurosci. 1999; 2:266–270.

Varela, L.; Horvath, T.L. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. EMBO Reports. 2012; 13:1079e1086.

Vickers, M.H. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. Nutrients. 2014; 6:2165–78.

Viollet, C.; Lepousez, G.; Loudes, C.; Videau, C.; Simon, A.; Epelbaum, J. Somatostatinergic systems in brain: networks and functions. Mol. Cell. Endocrinol. 2008; 286, 75–87.

Vitureira, N.; Goda, Y. Cell biology in neuroscience: the interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity. J Cell Biol. 2013; Oct 28;203(2):175-86.

Wan, Q.; Xiong, Z. G.; Man, H. Y.; Ackerley, C. A.; Braunton, J.; Lu, W. Y.; Becker, L. E.; MacDonald, J. F.; Wang, Y. T. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. Nature. 1997; 388, 686–690.

Weyhenmeyer, J. A.; Reiner, A. M.; Reynolds, I.; Killian, A. Light and electron microscopic analysis of insulin binding sites on neurons in dissociated brain cell cultures. Brain Res Bull. 1985; 14, 415–421.

White, M.F. Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. Can J Physiol Pharmacol. 2006; Jul;84(7):725-37.

Wiggins, R. C.; Fuller, G.; Enna, S. J. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. Life Sci. 1984; 35: 2085-2094.

Winick, M.; Noble, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. J Nutr. 1966; 89: 300-306.

Winick, M.; Rosso, P. The effect of severe early malnutrition on cellular growth of human brain. Pediatr Res. 1969; 3: 181-184

Wisden, W.; Seeburg, P.H. Mammalian ionotropic glutamate receptors. Curr. Op. Neurobiol. 1993; 3:291–98

Wolf C, Almli CR, Finger S et al. Behavioral effects of severe and moderate malnutrition. Physiol Behav. 1986; 38: 725–730.

Wolf, M.E. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. Prog Neurobiol. 1998; 54:679–720.

Wu, G.; Malinow, R.; Cline, H.T. Maturation of a central glutamatergic synapse. Science. 1996; 274:972–76

Yadav, D.; Chandra, J. Iron deficiency: beyond anemia. Indian J Pediatr. 2011; Jan; 78(1): 65-72.

Yamamoto, N.; Saitoh, M.; Moriuchi, A.; Nomura, M.; Okuyama, H. Effect of dietary alphalinolenate/linoleate balance on brain lipid compositions and learning ability of rats. J Lipid Res. 1987; 28:144-151.

Zamanillo, D.; Sprengel, R.; Hvalby, O.; Jensen, V.; Burnashev, N.; Rozov, A.; Kaiser, K.M.; Köster, H.J.; Borchardt, T.; Worley, P.; Lübke, J.; Frotscher, M.; Kelly, P.H.; Sommer, B.; Andersen, P.; Seeburg, P.H.; Sakmann, B. Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. Science. 1999; Jun 11;284(5421):1805-11.

Zhang, C.L.; Zou, Y.; He, W.; Gage, F.H.; Evans, R.M. A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. Nature. 2008; 451:1004–1007.

Zhao, W.; Chen, H.; Xu, H.; Moore, E.; Meiri, N.; Quon, M. J.; Alkon, D. L. Brain insulin receptors and spatial memory. J Biol Chem. 1999; 274, 34893–34902.

Zhao, W. Q.; Lacor, P. N.; Chen, H.; Lambert M. P., Quon M. J., Krafft G. a., Klein W. L. Insulin receptor dysfunction impairs cellular clearance of neurotoxic oligomeric Aβ. J. Biol. Chem. 2009; 284, 18742–18753.

Zhou, M.; Kimelberg, H.K. Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. The Journal of Neuroscience. 2001;21(20):7901–7908

Zhou, Q.; Xiao, M.; Nicoll, R. A. Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98, 1261–1266

Zhu, J.J.; Esteban, J.A.; Hayashi, Y.; Malinow, R. Synaptic potentiation during early development: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. Nat. Neurosci. 2000; 3:1098–1106