

Rui Miguel Cortês Mesquita

**EFEITOS DA MALNUTRIÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DO
BDNF E SEU RECEPTOR *trkB* NA FÁSCIA DENTEADA
DO RATO E SUAS REPERCUSSÕES COMPORTAMENTAIS**

**Porto
2001**

Rui Miguel Cortês Mesquita

**EFEITOS DA MALNUTRIÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DO
BDNF E SEU RECEPTOR trkB NA FÁSCIA DENTEADA DO
RATO E SUAS REPERCUSSÕES COMPORTAMENTAIS**

Trabalho complementar de Estágio para
obtenção da Licenciatura em Ciências da
Nutrição apresentado à Faculdade de
Ciências da Nutrição e Alimentação da
Universidade do Porto

Porto

2001

Trabalho realizado no Instituto de Anatomia e
Centro de Morfologia Experimental da Faculdade
de Medicina da Universidade do Porto, no âmbito
do Projecto PRAXIS C/SAU/13186/1998 da
Fundação para a Ciência e a Tecnologia

Ao meu Pai

À minha Mãe

Agradecimentos

Ao finalizar este trabalho de investigação tendo em vista a minha Licenciatura em Ciências da Nutrição, agradeço muito reconhecidamente ao Senhor Professor Doutor Manuel Paula Barbosa, Director do Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto e Coordenador Científico do Centro de Morfologia Experimental, não só pela permissão de que o meu estágio académico e realização do respectivo trabalho de investigação complementar fossem neles realizados mas também pelas disponibilidades que me proporcionou no decurso do trabalho e pelos ensinamentos que me transmitiu ao longo dos nove meses que tive oportunidade de partilhar com o grupo de investigação de que é responsável.

Ao Prof. Doutor José Paulo Andrade, meu orientador de estágio, agradeço a oportunidade de ter participado nos trabalhos do Projecto PRAXIS C/SAU/13186/1998 – Influência de factores neurotróficos nos fenómenos de degenerescência e reorganização neuronal induzidos pela hiponutrição – da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, de que é investigador responsável. Para além da amizade que me dispensou e da inextinguível dedicação que demonstrou durante todo o período de estágio, fico ainda reconhecido pelos conhecimentos e ensinamentos que me transmitiu.

Também ao Doutor Nikolai Lukoyanov expesso os meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos e apoio constantes indispensáveis à aprendizagem e realização dos testes comportamentais.

Não posso também deixar passar esta oportunidade sem agradecer a todos os investigadores do Instituto de Anatomia, em especial à Professora Doutora Maria Dulce Madeira, Professor Doutor António Cadete Leite e à Dra. Susana Silva, as palavras amigas e o entusiasmo que me dispensaram, contribuindo para que esta minha passagem por este Instituto não possa ser esquecida.

A todos os elementos da equipa técnica do Instituto de Anatomia aqui deixo também palavras de reconhecimento pelo apoio que sempre me prestaram.

Ao Alberto, meu colega de curso e companheiro de estágio, um agradecimento muito especial por todo o apoio que me prestou ao longo do tempo em que trabalhamos juntos no Instituto de Anatomia.

Agradeço por último, a todos os familiares e amigos que me apoiaram e compreenderam ao longo deste tempo.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

SNC-	sistema nervoso central
BDNF-	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
trkB-	receptor <i>tyrosine protein kinase B</i>
RNAm-	ácido ribonucleico mensageiro
C-	animais controles
RA-	animais submetidos a restrição alimentar
RP-	Animais submetidos a restrição proteica
GABA-	ácido γ -amino-butírico
ANOVA-	análise de variância
CG-	camada granular
CM-	camada molecular
H-	região do hilo
NGF-	<i>nerve growth factor</i>
trkC-	receptor <i>tyrosine protein kinase C</i>
NT-3-	neurotrofina 3
NT-4/5-	neurotrofina 4/5

2.1. Neurónios BDNF-positivos25
2.2. Neurónios trkB-positivos26
3. Avaliação semi-quantitativa dos níveis de RNAm do BDNF e do RNAm do trkB27
4. Testes comportamentais29
4.1. <i>Open field</i>29
4.2. <i>Passive avoidance</i>30
4.3. <i>Water maze</i>31
Discussão34
Conclusões43
Bibliografia45



RESUMO

A formação do hipocampo, estrutura chave no processamento da aprendizagem e memória, é das áreas do SNC mais vulneráveis a agressões ambientais, entre as quais se inclui a malnutrição. O objectivo deste trabalho foi avaliar as implicações morfológicas e comportamentais de dois modelos de malnutrição crónica no Rato adulto. Estudaram-se as células granulares da fásia dentada quantificando o número das que são imunoreactivas para a neurotrofina BDNF e para o seu receptor específico trkB, bem como os respectivos RNA mensageiros (RNAm). Grupos de animais adultos (dois meses de idade) foram submetidos a restrição alimentar (restrição calórica de 40%) e a ingestão de dieta hipoproteica (8% de caseína) durante sete meses e os resultados obtidos comparados com os encontrados num grupo controlo em que os animais tinham acesso a dieta nutricionalmente equilibrada. Foi observado que a restrição alimentar provoca redução significativa (15%) do número total de neurónios BDNF-imunoreactivos sem alteração do número de neurónios trkB-positivos. Sob o ponto de vista comportamental estes animais revelaram aumento da actividade motora, não apresentando contudo alterações na aprendizagem e memória testadas no *water maze*. Em contraste, os animais sujeitos a privação proteica apresentaram redução significativa do número de células granulares imunoreactivas para o BDNF (21%) e também para o trkB (22%) e diminuição dos níveis dos respectivos RNAm. Para além disso revelaram marcadas alterações comportamentais com défices de aprendizagem. Concluindo, embora ambos os

modelos de malnutrição induzam redução do número de células granulares da fásia denteada BDNF-positivas, nos animais submetidos a dieta hipoproteica esta diminuição é mais elevada e acompanhada de redução dos restantes parâmetros quantitativos avaliados, tendo os testes comportamentais revelado alterações cognitivas notórias.

Palavras-chave: malnutrição, formação do hipocampo, BDNF, trkB, imunocitoquímica, hibridização *in situ*, estereologia, comportamento, Rato.

INTRODUÇÃO

A malnutrição é um dos mais importantes problemas médicos e sociais do mundo actual, constituindo objecto de preocupação de autoridades sanitárias e governamentais bem como de organizações internacionais, algumas das quais perseguindo como objectivos fundamentais o combate e a prevenção de tal flagelo como a FAO, a OMS e a UNESCO. De facto, segundo as estimativas mais optimistas, 10% a 15% da população mundial sofre de carências alimentares, o que confere a esta situação uma dimensão catastrófica (1,2).

De entre todos os elementos constituintes das dietas são as proteínas, principalmente as de origem animal, o macronutriente cuja carência, por razões de origem económica, é mais prevalente não só nos países do chamado terceiro mundo mas também naqueles considerados economicamente desenvolvidos, entre os quais se inclui Portugal (3).

A malnutrição em consequência de dietas deficientes em proteínas provoca, nas suas formas extremas, síndromes clínicas muito complexos que reflectem alterações estruturais e funcionais de todos os órgãos do corpo humano (4,5). No entanto existem formas mais subtis nas quais a carência crónica de proteínas na dieta e consequente desequilíbrio alimentar são parcialmente ocultadas pelo excesso de outros nutrientes como os hidratos de carbono e as gorduras. Numerosos indivíduos - crianças, jovens ou adultos - alimentados com dietas deficientes em proteínas sofrem de doenças neurológicas que se traduzem sobretudo por alterações cognitivas, especialmente ao nível da aprendizagem e

da memória, que se sabe dependerem de estruturas específicas do sistema nervoso central (SNC). São numerosos os trabalhos experimentais que mostram que o desenvolvimento do SNC dos roedores é profundamente afectado pela malnutrição quer esta decorra no decurso do período pré-natal quer seja instituída no período neonatal (6-9), épocas em que a neurogénese se processa a ritmo muito elevado. Já o cérebro dos animais adultos foi muito tempo considerado como extremamente resistente às deficiências alimentares (7-9).

Porém, trabalhos realizados desde há vários anos no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto contrariam esta noção quase secular (10,11), dado que têm mostrado a existência de uma inequívoca degenerescência neuronal em certas regiões do cérebro do Rato adulto, nomeadamente na formação do hipocampo onde a morte neuronal chega a atingir 40% após seis meses de alimentação pobre em proteínas, embora suficientemente equilibrada em calorias, vitaminas e sais minerais (11-16). É de salientar que para além destes fenómenos degenerativos foi simultaneamente observada uma exuberante actividade reorganizativa a nível dendrítico, axonal e sináptico após reabilitação nutricional (15,16). Nas mesmas condições experimentais foram ainda observados fenómenos quer degenerativos quer reorganizativos ao nível dos sistemas colinérgico e GABAérgico da formação do hipocampo (14). Surpreendentemente, esta área do SNC mostrou-se resistente a outro paradigma de malnutrição, a restrição alimentar. Neste modelo, no qual os animais ingerem apenas 60% das calorias consideradas como norma para estes roedores no contexto de uma dieta equilibrada (17,18), não foi observada morte neuronal na formação do hipocampo (19).

As alterações degenerativas observadas após deficiência de proteínas na dieta alimentar são provavelmente devidas a distúrbios específicos dos neurónios da formação do hipocampo, já que não se observam no córtex pré-frontal (20) e no córtex entorrinal (15), embora esta última seja uma região do SNC com a qual a formação do hipocampo possui grande número de conexões através de sistemas organizados de fibras (21). Uma das razões apontadas para esta diferente vulnerabilidade é o conteúdo e a dependência de neurotrofinas nas diferentes populações neuronais das diversas regiões do SNC (15,22). É provável que os mecanismos da síntese, transporte e libertação de factores neurotróficos estejam alterados em consequência da redução da síntese proteica observada após a privação de proteínas (22,23). Sendo assim, a restrição proteica pode afectar a disponibilidade de aminoácidos essenciais para a síntese proteica e para a produção de neurotrofinas (22,23).

As consequências funcionais do emprego destas dietas no animal adulto estão pouco avaliadas. No entanto, estudos realizados em primatas não humanos filogeneticamente mais próximos do Homem, demonstraram a existência de importantes alterações comportamentais após longos períodos de ingestão de dietas hipoproteicas. Com efeito, macacos Rhesus alimentados com este tipo de dieta mostraram apatia em relação ao meio ambiente, diminuição da capacidade de exploração e redução de actividades lúdicas, para além de alterações na aprendizagem e memória (24-26), funções dependentes em grande parte da formação do hipocampo (27).

Quanto à restrição alimentar, tem sido implicada como responsável pelo aumento do tempo de vida nos roedores, retardando os efeitos do processo de envelhecimento e prevenindo o aparecimento de diferentes patologias

relacionadas com o avançar da idade (17,28-34). A restrição alimentar acarreta também diminuição das alterações morfológicas e funcionais a nível cerebral geralmente observadas no envelhecimento e melhora a capacidade de resposta do SNC aos efeitos de diversos agentes neurotóxicos (35). Foi ainda demonstrado que a restrição alimentar provoca diminuição da densidade dos receptores de glucocorticóides no cérebro, responsáveis pela alteração dos processos de aprendizagem e memória e acelerar a degenerescência neuronal como a que ocorre no Homem na doença de Alzheimer (36). Por outro lado, pode acarretar outras consequências negativas como apatia, intolerância ao frio, redução da capacidade de reacção a novos estímulos (37), atraso nos fenómenos de cicatrização (38), neuropatia periférica (39) e alterações quer dos níveis séricos das hormonas sexuais quer do comportamento sexual (40,41). Todas estas observações chamam a atenção para a necessidade da avaliação e interpretação cuidada dos efeitos da restrição alimentar no cérebro, exigindo um estudo aprofundado das possíveis alterações morfológicas e funcionais resultantes deste tipo de privação nutricional.

Tal como noutros estudos realizados no Instituto de Anatomia, o presente modelo experimental utilizou o Rato e tentou mimetizar as condições nutricionais a que estão submetidos numerosos grupos populacionais que ingerem por longos períodos, ou até durante toda a vida, uma dieta deficiente em proteínas ou pobre em calorias. Não foi aleatória a escolha de uma dieta hipoproteica contendo 8% de caseína. Estudos anteriores mostraram que ratos adultos sujeitos durante alguns meses a uma dieta em que a percentagem de proteínas é de apenas 6% sofrem uma acentuada redução do peso corporal semelhante à verificada em ratos submetidos a modelos de restrição alimentar conducentes a desnutrição

grave (42,43). A quantidade de proteínas (8%) fornecida pela dieta utilizada no presente modelo representa o limiar de aporte proteico que conduz a uma situação carencial de instalação insidiosa, mantendo os animais com aparência e características somáticas externas em tudo sobreponíveis às dos animais que ingerem dietas nutricionalmente equilibradas (42,43). Em relação à restrição alimentar, utilizou-se um modelo no qual os animais são submetidos a restrição correspondente a uma diminuição de 40% de calorias, frequentemente citado na literatura (17-19).

A formação do hipocampo foi a região do SNC seleccionada para o presente trabalho. Apresenta uma estrutura relativamente simples e bem definida o que facilita a avaliação quantitativa de eventuais alterações morfológicas (21). Além disso ocupa uma posição estratégica no processamento de informação entre o neocórtex e as estruturas subcorticais, estando englobada no sistema límbico que desempenha papel fundamental na modulação de comportamentos complexos (27). De facto, é uma região do SNC implicada nas actividades afectivas e cognitivas, essencialmente nos fenómenos de aprendizagem e memória, e extremamente vulnerável às carências nutricionais (11-16,44). A população neuronal escolhida para os estudos morfológicos foram as células granulares da fáscia denteada devido à peculiaridade da sua neurogénese. Com efeito esta neurogénese no Rato prolonga-se pela vida adulta, ocorrendo simultaneamente uma enorme plasticidade ao nível das arborizações dendríticas e das sinapses destas células (45-49). Tanto esta neurogénese como a referida plasticidade são extremamente dependentes do nível de *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) e do seu receptor mais específico, *tyrosine protein kinase B* (trkB) (50,51). Este factor neurotrófico é essencial à sobrevivência das

populações neuronais em geral e dos neurónios da formação do hipocampo em particular (52).

Utilizaram-se basicamente técnicas de imunocitoquímica e de hibridização *in situ*. As quantificações foram feitas empregando metodologia estereológica adequada. Assim, foi estimado o número total de células granulares imunoreactivas quer para o BDNF quer para o trkB em formações do hipocampo de ratos submetidos a restrição alimentar durante 7 meses e alimentados com dieta hipoproteica durante o mesmo período de tempo e dos respectivos controlos com a mesma idade. Foram determinados ainda, recorrendo a técnicas de hibridização *in situ*, os níveis de RNA mensageiro (RNAm) do BDNF e do trkB.

Como existe uma relação positiva entre o conteúdo de BDNF e o desempenho de roedores em vários estudos comportamentais (51), efectuaram-se vários testes específicos para detecção de alterações na aprendizagem e memória dependentes da integridade morfológica da formação do hipocampo (53,54): *open field*, *passive avoidance* e *water maze* (55).

OBJECTIVOS

Ao estudar os efeitos morfológicos e comportamentais da restrição alimentar e da malnutrição proteica no Rato adulto procurou-se obter resposta para as seguintes questões:

- Será que a malnutrição proteica e a restrição alimentar crónicas têm efeitos deletérios na formação do hipocampo do Rato adulto, especificamente no número de células granulares imunoreactivas para o BDNF e para o trkB?
- Será que existe alteração do nível de RNAm do BDNF e do RNAm do trkB nestas mesmas células da formação do hipocampo e nas mesmas circunstâncias experimentais?
- Será que as dietas hipoproteicas e a restrição alimentar provocam alterações comportamentais no Rato adulto? Mais especificamente, será que existem alterações na execução de tarefas dependentes da integridade morfológica da formação do hipocampo?

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais e tratamentos

Este trabalho foi realizado em ratos machos da estirpe Wistar provenientes do Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência (Oeiras, Portugal) ou seus descendentes nascidos no Biotério do Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto. Os animais foram mantidos em condições laboratoriais padrão, isto é, submetidos a um ciclo de luz/escuridão (12:12h) e mantidos à temperatura ambiente de 20-22°C. Até às 8 semanas de idade todos os animais tiveram livre acesso a água e a dieta normal para ratos de laboratório (PANLAB, S.L., Espanha), cuja composição é a seguinte: grãos de cereais, sementes de oleaginosas, produtos e subprodutos de grãos de cereais e de sementes de oleaginosas, produtos de panificação e massas alimentícias, produtos de pescado e sais minerais. Em termos analíticos esta composição possui 15,6% de proteínas, 2,8% de gorduras, 4,8% de celulose e 4,6% de sais minerais. Esta dieta é suplementada com 7500 U.I. de vitamina A, 1500 U.I. de vitamina D3, 15 mg de vitamina E (alfa-tocoferol) e 14,7 mg de cobre (sulfato cúprico penta hidratado) por quilograma e fornece 376,4 Kcal/100 gramas.

Às 8 semanas de idade todos os animais foram colocados em gaiolas individuais e, após selecção aleatória, agrupados do seguinte modo:

a) **Animais controles** - Dez animais permaneceram com acesso livre à dieta normal para ratos de laboratório e a água ao longo de todo o estudo. A quantidade de dieta ingerida por estes animais foi de $30,6 \pm 1,25$ g/dia.

b) **Animais submetidos a malnutrição proteica** - Dez ratos foram alimentados durante 7 meses com dieta hipoproteica (*Low 8% Protein Diet*, ICN Biomedicals, EUA) a partir dos 2 meses de idade até ao final do estudo. Esta dieta fornece 434 Kcal/100 g e apresenta a seguinte composição: 8,0% de caseína, 78,0% de amido de milho, 10,0% de gorduras, 4,0% de sais minerais e 1% de suplementos vitamínicos (*ICN Vitamin Diet Fortification Mixture*). Como a caseína é pobre em alguns aminoácidos essenciais, esta dieta foi suplementada ainda com 0,7% de lisina e 0,5% de metionina e cistina. Estes animais tiveram acesso livre quer à dieta quer a água.

c) **Animais submetidos a restrição alimentar** - Dez animais foram submetidos a uma restrição alimentar de 40%, desde os 2 meses de idade até ao final do estudo. Estes animais dispunham unicamente de 18–20 gramas diárias da dieta normal para ratos de laboratório já referida, fornecida às 8.00 horas, embora com acesso livre a água.

Durante todo o período experimental, todos os animais foram pesados semanalmente, no mesmo dia da semana, à mesma hora.

2. Processamento do material

2.1. Fixação

No final do período experimental (9 meses de idade) e após a realização dos testes comportamentais, cinco animais por grupo foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (80 mg/Kg) e perfundidos durante 15–20 minutos por via transcardíaca com 200 ml de tampão fosfato 0,1 M como solução de lavagem, seguidos de 400 ml de solução fixadora contendo 4% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6. Todos os animais foram perfundidos às 14.00 horas.

Terminada a perfusão procedeu-se à abertura da cavidade craniana e à remoção do encéfalo que depois de isolado era pesado e codificado para permitir análise cega sem identificação do animal. Os cérebros eram em seguida imersos na solução fixadora durante 2 horas à temperatura ambiente e depois numa solução de sacarose a 30% em tampão fosfato durante 15 horas, à temperatura de 4°C.

Os pólos frontais e occipitais dos hemisférios cerebrais foram removidos através de duas secções coronais: a anterior efectuada caudalmente ao bordo posterior do quiasma óptico e a posterior imediatamente rostral ao pólo occipital. Os blocos encefálicos assim obtidos foram seccionados seriadamente, no plano coronal, em cortes de 50 µm de espessura utilizando um vibratomo. Os cortes eram recolhidos para cavidades contendo solução crioprotectora e armazenados a -15°C até ao processamento imunocitoquímico ou de hibridização *in situ*.

Toda a manipulação dos cérebros e preparação de todos os meios líquidos foi efectuada em condições laboratoriais que se consideram ser estéreis e isentas de RNAses que poderiam levar à degradação do RNAm.

2.2. Imunocitoquímica

2.2.1. Processamento imunocitoquímico

Para o estudo imunocitoquímico foram utilizados anticorpos contra o BDNF e contra o trkB (Peninsula Laboratories, EUA). Da totalidade dos cortes contendo a formação do hipocampo seleccionou-se, utilizando um método de escolha simultaneamente aleatória e sistemática (56), um conjunto mais pequeno para a realização de coloração imunocitoquímica e ulteriores análises estereológicas. Assim, com o auxílio de uma tabela de números aleatórios, escolheu-se o primeiro corte a partir do mais rostral conjunto de cinco, nos quais a formação do hipocampo era identificável; os restantes cortes foram seleccionados de modo sistemático, ou seja, a intervalos regulares de um em cada cinco cortes consecutivos, ao longo de toda a extensão rostro-caudal da formação do hipocampo. Deste modo, para cada um dos anticorpos, seleccionaram-se em média 15 cortes para realização de coloração imunocitoquímica e consequente análise estereológica. A reacção imunocitoquímica foi realizada em cortes flutuantes em grupos de cinco em cada cavidade. Depois de submetidos a três lavagens com tampão fosfato para retirar os resíduos de solução crioprotectora, os cortes foram tratados com uma solução de peróxido de hidrogénio a 3% durante 7 minutos para inactivar as peroxidases endógenas. Quer o anticorpo contra o BDNF quer o anticorpo contra o trkB foram diluídos numa concentração de 1:500 numa solução de tampão fosfato contendo 0,5% Triton X-100. Este

detergente foi utilizado em todas as reacções de modo a permitir uma permeabilização das membranas e possibilitar melhor penetração dos anticorpos no tecido. Todos os cortes foram incubados durante 18 horas, em agitação, com o respectivo anticorpo primário (anti-BDNF ou anti-trkB), à temperatura de 4°C. Como anticorpo secundário foi utilizado um anticorpo biotilado anti-imunoglobulinas G de coelho proveniente de cordeiro (Vector Laboratories, Inglaterra) na diluição de 1:400. Em seguida, os cortes foram tratados com um complexo avidina-biotina peroxidase (ABC) (Vector Laboratories) na diluição de 1:800. Ambas as incubações ocorreram à temperatura ambiente e tiveram a duração de 1 hora. Seguidamente, os cortes foram tratados com diaminobenzidina (DAB, Sigma, EUA) durante 10 minutos, após o que foi feita a reacção com peróxido de hidrogénio para revelar a coloração imunocitoquímica. Após lavagem em tampão fosfato, os cortes foram montados seriadamente em lâminas gelatinadas e depois desidratados em soluções alcoólicas de concentração crescente (50%, 70%, 90% e 100%, 1 minuto cada), passados por xilol para retirar o excesso de álcool e finalmente cobertos com lamelas, utilizando como meio de montagem o Histomount.

2.2.2. Controlo imunocitoquímico

Para controlo imunocitoquímico, um corte por animal foi incubado em tampão fosfato com 0,5% de Triton X-100 sem anticorpo primário e em outro não ocorreu a incubação em anticorpo secundário. De resto, todo o processamento foi semelhante ao dos restantes cortes, tendo-se verificado que nenhum dos cortes controlo revelou marcação específica.

2.3. Hibridização *in situ*

2.3.1. Sondas de oligonucleotídeos

Para este tipo de processamento foram utilizados 12 cortes de 50 μm contendo a formação do hipocampo. As sondas a empregar foram seleccionadas de maneira a serem complementares do RNAm dos genes do Rato. Assim, para o BDNF foram seleccionados os nucleotídeos 657-702 (57), constituindo uma sonda de 46 bases e para o *trkB* os nucleotídeos foram os 1551-1598, sendo utilizada uma sonda com 48 bases (58). As sondas foram sintetizadas por uma empresa especializada e modificadas na sua extremidade 3' com a incorporação de digoxigenina (MWG-Biotech, Ebesberg, Alemanha).

2.3.2. Técnica de hibridização *in situ*

Antes da hibridização os cortes foram lavados três vezes em tampão fosfato à temperatura ambiente e tratados com proteinase K (Sigma) durante 7 minutos para desnaturação e permeabilização das membranas celulares. Todas as soluções foram realizadas com água ultrapura e tratadas com dietilpírocarbonato (DEPC, Sigma), um inibidor das RNAses. Em seguida os cortes foram incubados (2 por cavidade) no meio de hibridização constituído por 200 μl de solução Denhart 1X, 500 μl de laureato de sarcosil a 1%, 2 ml de sulfato de dextrano a 10%, 2 ml de citrato de sódio salino (SSC) 4X, 5 ml de formamida a 50% e 0,3 ml de água tratada com DEPC, todos da Sigma, num total de 10 ml. As sondas tiveram a concentração de 100 e 50 ng/ml para o *trkB* e BDNF, respectivamente. A reacção de hibridização ocorreu durante 18 h à temperatura de 40°C.

Procedeu-se depois ao tratamento dos cortes com soluções de concentração decrescente de SSC para remoção de hibridização não específica. Assim foram efectuadas lavagens em SSC 4X durante 15 minutos à temperatura ambiente, três lavagens em SSC 1X a 40°C (15 + 30 + 30 minutos, respectivamente) e duas lavagens (30 minutos cada uma) a 40°C em SSC 0,1X. No passo seguinte procedeu-se à detecção das sequências hibridizadas, utilizando um anticorpo anti-digoxigenina com fosfatase alcalina (Roche, Suíça) numa solução tampão bloqueadora (Roche) à temperatura ambiente e durante 1 hora, seguida de uma lavagem com uma solução apropriada (Roche).

A actividade da fosfatase alcalina foi demonstrada usando fosfatase 5-bromo-4-cloro-indolil e nitroazul tetrazolíneo (NBT/BCIP, Roche), após incubação durante a noite à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Por fim os cortes foram lavados em tampão fosfato e depois montados em lâminas gelatinadas, procedendo-se em seguida à sua desidratação com soluções de concentração crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%, 1 minuto cada). O excesso de acetona foi retirado com lavagem em xilol, sendo utilizado Histomount como meio de montagem em lâminas.

2.3.3. Controlo da hibridização

Quatro cortes por animal foram incubados no meio de hibridização sem sonda de oligonucleotídeos e em outros tantos foi omissa a incubação com o anticorpo anti-digoxigenina. Todo o resto do processamento dos cortes controlo foi idêntico ao dos restantes, tendo-se verificado que, após revelação, nenhum dos controlos mostrou marcação específica.

2.3.4. Análise semi-quantitativa do RNAm do BDNF e do RNAm do trkB

A intensidade do sinal de hibridização do RNAm do BDNF e do RNAm do trkB foi avaliada na camada granular da fáscia denteada por dois investigadores independentes. A escala utilizada variou entre 0 e +++, considerando 0 para controlo, + para um sinal ligeiro de marcação perinuclear, ++ para um sinal moderado na zona perinuclear em células bem individualizadas e +++ para um sinal muito forte na zona perinuclear bem como na parte proximal dos neuritos celulares.

3. Análise estereológica

O número total de neurónios marcados imunocitoquimicamente com os anticorpos anti-BDNF e anti-trkB (Fig. 1) foi estimado pelo método do *fractionator* óptico (59-62), utilizando um sistema de análise estereológica video CAST-GRID (Olympus Danmark A/S, Dinamarca) e um microscópio Olympus BH-2 acoplado a uma câmara de video Sony CCD-Iris MTV-3. Esta câmara fazia interface com um monitor a cores, onde se visualizavam os cortes histológicos, através de um adaptador de video Sony e um computador IBM. Os movimentos da platina do microscópio ao longo dos eixos x e y eram controlados através de um sistema motorizado e a medição dos movimentos verticais, isto é, ao longo do eixo z , era efectuada com o auxílio de um microcator digital Heidenhain MT-12 (Heidenhain GmbH, Alemanha), igualmente conectado à platina do microscópio.

Em cada corte os neurónios foram contados através do *disector* óptico (59-63). Este método consiste na contagem do número de partículas que pela primeira vez aparecem em foco dentro dos limites de uma grelha rectangular, a área do *disector* e numa fracção fixa de espessura do corte, a altura do *disector*.

Figura 1. Fotografias de cortes coronais da camada granular (CG) da fásia denteada da formação do hipocampo de um animal controlo tratados imunocitoquimicamente com anticorpos anti-BDNF (A) e anti-trkB (B), nas quais estão assinaladas com setas células imunoreactivas para o BDNF (A) e para o seu receptor trkB (B). Em B observa-se um dendrito de uma célula granular trkB-imunoreactiva atravessando toda a camada granular (pontas de seta). CM – camada molecular; H – hilo. Barras = 20 μ m.

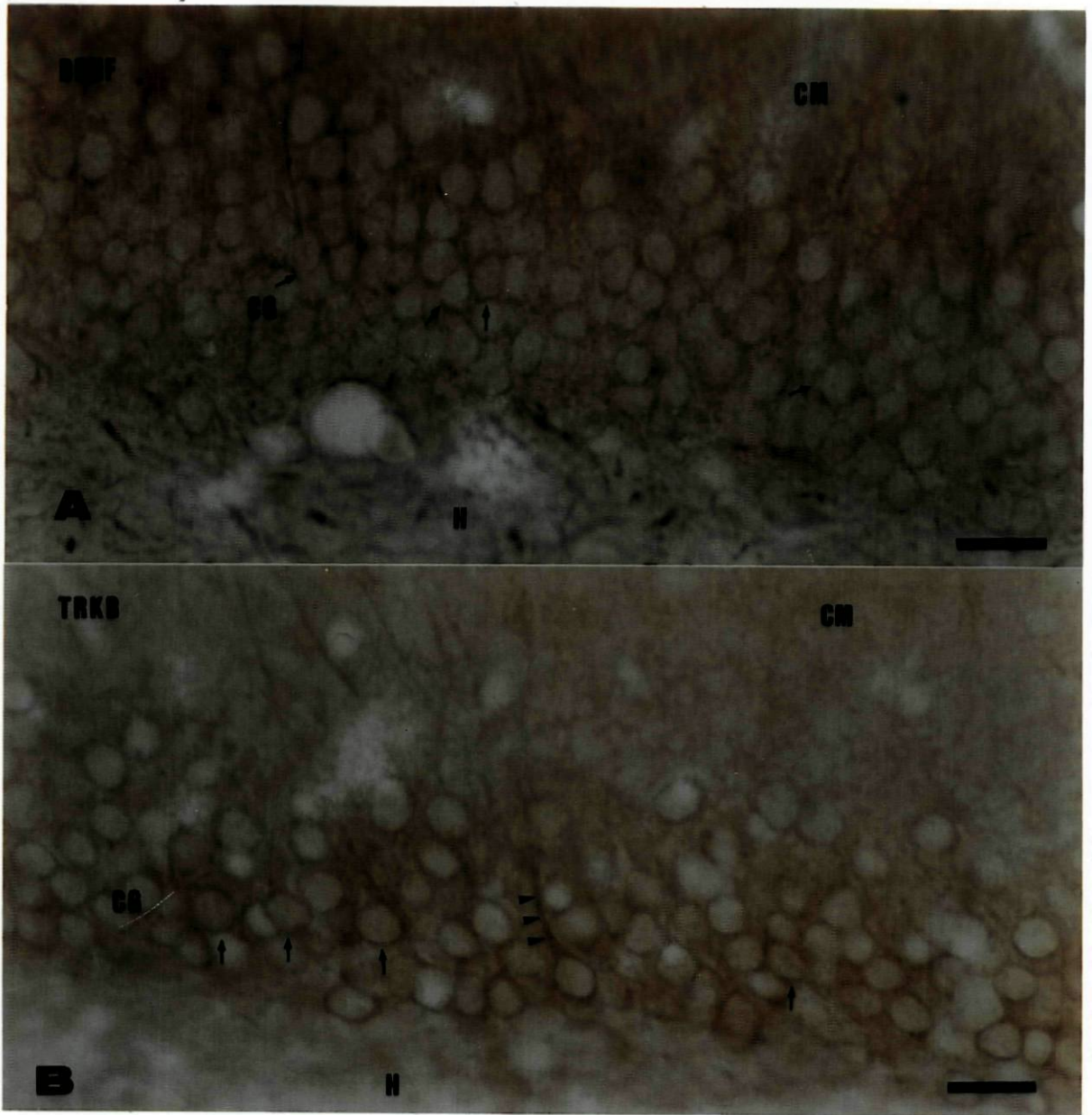


FIG.1

As contagens obedeceram à regra das linhas proibidas de Gundersen (64) que exclui as partículas que são interceptadas pelos lados inferior e esquerdo da grelha rectangular.

Em resumo, no caso presente a técnica do *fractionator* óptico consistiu no seguinte: a partir de uma posição inicial aleatória, fora dos limites da camada granular, procedeu-se à deslocação sistemática do corte de acordo com as amplitudes de deslocação atribuídas para os eixos x e y , que para ambas as colorações imunocitoquímicas foi de $200\ \mu\text{m}$. A grelha de contagem tinha uma área de $900\ \mu\text{m}^2$. Nas posições em que a grelha se sobrepunha à camada granular, depois de focar a superfície do corte avançavam-se $4\ \mu\text{m}$ através da sua espessura (eixo z); assim ficava definido o plano óptico a partir do qual se realizavam as contagens com objectiva de imersão 100X (ampliação final de 2000X). As partículas contadas foram todos os núcleos neuronais que, dentro da grelha de contagem, assumiam pela primeira vez o melhor foco à medida que se aprofundava o mesmo através das $10\ \mu\text{m}$ seguintes da espessura do corte, ou seja, ao longo da altura do *disector*. Em média contaram-se 130 neurónios por animal. Para cada corte estudado registou-se o número de *disectors* efectuados (F) e o número de células contado em cada *disector* (Q^-). O número total de neurónios (N) foi calculado segundo a fórmula:

$$N = \Sigma Q^- \times 1/ssf \times 1/asf \times t / h$$

na qual ΣQ^- é o número total de neurónios efectivamente contado nos *disectors* que caíam nos perfis de cada secção observada na amostragem, *ssf* representa a

fracção das secções considerada ou *section sampling fraction* (neste caso o *ssf* foi 0,2, já que foi escolhido 1 em cada 5 cortes), *asf* corresponde à *area sampling fraction*, ou seja, a área total que é alvo da contagem (área da grelha de contagem/área $x \times y$), t é a espessura real do corte (em média $17 \mu\text{m}$) e h é a altura do *disector* ($10 \mu\text{m}$).

O coeficiente de erro (CE) da estimativa do número total de neurónios, calculado de acordo com Gundersen *et al.* (65), foi de 0,09 para os BDNF-positivos enquanto que no caso dos neurónios *trkB*-positivos foi de 0,08.

4. Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram iniciados quando a totalidade dos animais (dez por cada grupo) tinha 8 meses de idade. Os ratos foram manuseados durante 5 dias (3 minutos por dia) para habituação à manipulação e depois submetidos ao teste do *open field* durante 4 dias consecutivos com o objectivo de avaliar o seu estado emocional e a adaptação a novas situações. O comportamento dos animais no teste *passive avoidance* foi avaliado 3 dias depois. Cerca de 10 dias após este teste, os animais foram familiarizados com o teste *water maze* (30 segundos por dia durante 2 dias) e depois treinados durante 12 dias para avaliar a sua aprendizagem espacial através duma *probe trial*. Subsequentemente foi realizado no *water maze* o teste de aprendizagem com a plataforma visível.

Todos os testes foram efectuados após 30 minutos de habituação à sala onde se realizavam e sempre com início às 14.00h.

4.1. *Open field*

Após os 5 dias de manuseamento, os ratos foram testados no *open field*. Este teste foi realizado numa arena quadrangular em acrílico branco opaco, medindo 100x100 cm e 40 cm de altura. O pavimento da arena era formado por uma grelha dividida em 25 quadrados (20x20 cm). Para análise comportamental, consideraram-se duas áreas: uma periférica (16 quadrados ao longo das paredes) e uma central (nove quadrados na parte central da arena). No início de cada teste, os animais foram colocados num dos cantos e voltados para a parede da arena. A duração de cada prova era de 5 minutos e o investigador contava o número de linhas atravessadas pelo animal na parte periférica (actividade locomotora periférica) o número de linhas atravessadas na parte central (actividade locomotora central). Entre as várias sessões, o pavimento da arena era cuidadosamente lavado com água e devidamente seco.

4.2. *Passive avoidance*

Este teste foi efectuado numa caixa aberta de madeira com as dimensões 50x50x50 cm, cujo pavimento era constituído por uma rede metálica à qual se encontrava aplicado um gerador de corrente eléctrica (A320 Isostim, WPI Inc., EUA). No centro da rede metálica encontrava-se fixada uma plataforma circular de madeira (15 cm de diâmetro e 5 cm de espessura) rodeada por um tubo de plástico opaco (16 cm de diâmetro e 50 cm de altura) colocado verticalmente sobre a rede metálica. Os ratos eram colocados na plataforma e o tubo de plástico removido do sistema 15 segundos depois. O tempo de latência, isto é, o tempo que o animal levava a abandonar a plataforma, era registado e cada animal

repetia três vezes este procedimento com intervalos de 30 minutos entre cada um. No terceiro ensaio deste período de treino, quando o animal abandonava a plataforma e colocava as patas dianteiras na rede metálica, era aplicado um choque eléctrico (1mA durante 1 segundo) na referida rede. Após receber o choque o rato regressava à sua habitual gaiola. Este procedimento foi repetido 24 h depois aplicando a mesma metodologia (teste de retenção), com excepção do choque eléctrico que não era aplicado à estrutura metálica.

4.3. Water maze

Este teste comportamental foi realizado numa piscina circular de parede e fundo negros com 180 cm de diâmetro e 50 cm de profundidade, cheia de água à temperatura ambiente ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) até ao nível de 35 cm. A piscina era dividida por linhas imaginárias em quatro quadrantes. O percurso percorrido pelos ratos na piscina era registado por um sistema de video computadorizado (EthoVision, V1.90, Noldus, Holanda). Numa primeira fase, os animais foram treinados 12 dias consecutivos para encontrar uma plataforma (10 cm de diâmetro) localizada no centro de um dos quadrantes e escondida 2 cm abaixo da superfície da água. Cada rato era colocado na água em um de quatro pontos de partida pré-definidos de forma que cada uma das posições só era usada uma vez em cada um dos ensaios. Se os animais não encontrassem a plataforma num espaço de 60 segundos o investigador guiava o animal até à plataforma, permitindo que este permanecesse ali durante 15 segundos. No final do primeiro ensaio o rato era enxugado e colocado numa gaiola limpa durante 30 segundos, após o que se iniciava o segundo ensaio mantendo a plataforma no mesmo quadrante. O percurso percorrido pelo rato e a velocidade com que o fazia ficavam registados

pelo sistema computadorizado. Um dia após a conclusão dos ensaios os animais eram submetidos ao teste *probe trial*, durante 60 segundos, no qual a plataforma era removida da piscina. Eram então registados quer o número de vezes que os animais cruzavam o local onde se encontrava previamente a plataforma quer o tempo permanecido no quadrante onde esta se encontraria.

No teste da plataforma visível cada rato foi submetido a quatro ensaios, intervalados de 30 segundos. A plataforma, pintada de branco, encontrava-se 3 cm acima da superfície da água. A posição da plataforma era diferente em cada ensaio e a distância percorrida para a sua localização era registada.

5. Análise estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram estatisticamente analisados através da aplicação do teste de análise de variância (ANOVA) para um factor, o tratamento, excepto os respeitantes às variações de peso corporal em que um outro factor, o tempo de experiência, foi também considerado. A ANOVA para um ou dois factores, foi igualmente aplicada aos resultados comportamentais.

Para verificar se as médias obtidas nos diferentes grupos analisados diferiam significativamente entre si, utilizou-se o teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Os resultados apresentados são expressos em média e respectivo desvio padrão. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

1. Animais e dietas

Os pesos corporais médios dos animais controlo, submetidos a restrição alimentar e alimentados com dieta pobre em proteínas estão representados graficamente na Figura 2. A análise da variância (ANOVA) revelou existência de efeito significativo da dieta ($F_{2,27} = 225,11$, $P < 0,0001$) e interacção significativa entre o tempo de experiência e o regime alimentar ($F_{36,756} = 119,31$, $P < 0,0001$) nas variações dos pesos corporais entre os diferentes grupos experimentais. O peso corporal dos animais submetidos a restrição alimentar era significativamente menor que o dos ratos quer controlos quer submetidos a dieta hipoproteica. Enquanto que o peso corporal médio dos animais sujeitos a restrição alimentar permaneceu relativamente estável, o dos ratos controlos e o dos alimentados com dieta pobre em proteínas aumentaram progressivamente ao longo do período experimental.

No fim da experiência, o peso corporal médio dos ratos controlos e dos alimentados com dieta hipoproteica era aproximadamente 100% mais elevado que o dos ratos submetidos a restrição alimentar. Não foram observadas diferenças significativas entre os pesos corporais dos ratos controlos e dos alimentados com dieta hipoproteica.

A ANOVA mostrou não existir efeito significativo do regime alimentar no peso médio dos cérebros dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os valores encontrados foram de $1,54 \pm 0,05$ g para os animais controlos, $1,54 \pm 0,04$

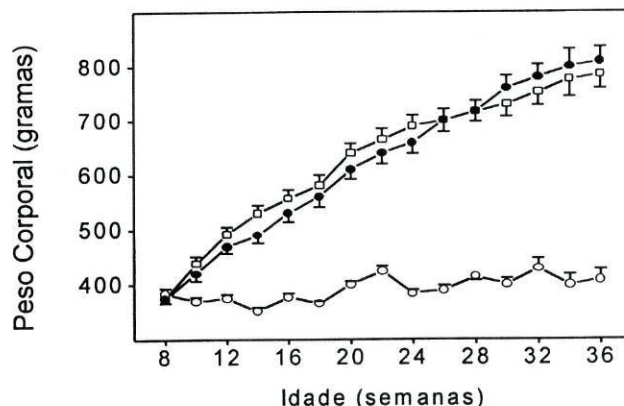


Figura 2. Evolução do peso corporal dos animais controlos (quadrados), submetidos a restrição alimentar (círculos em branco) e sujeitos a restrição proteica (círculos a negro) durante todo o período experimental.

g para os ratos submetidos a restrição alimentar e $1,53 \pm 0,05$ g para os animais alimentados com dieta carente em proteínas.

2. Número total de neurónios

2.1. Neurónios BDNF-positivos

A aplicação da ANOVA revelou que as variações encontradas no número total de neurónios da camada granular da fáscia denteada BDNF-imunoreactivos são dependentes do factor dieta ($F_{2,12} = 66,46$, $P < 0,0005$). A observação da Figura 3 permite concluir que o número total destes neurónios é significativamente maior no grupo de animais controlos quando comparado com o dos ratos submetidos a dieta hipoproteica e a restrição alimentar. Com efeito, existe uma diminuição de 21% no número total de neurónios BDNF-positivos no grupo de ratos alimentados com dieta hipoproteica e de 15% no dos ratos submetidos a

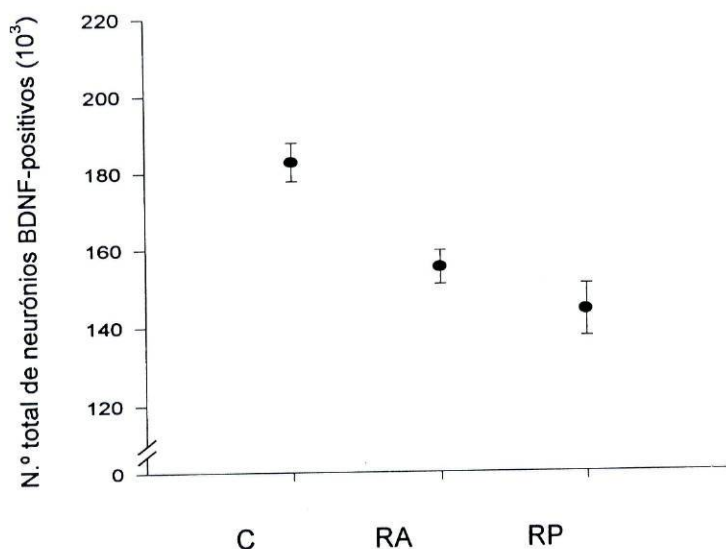


Figura 3. Representação gráfica do número total de neurónios BDNF-
 imunoreactivos da camada granular da fásia denteada, nos grupos de ratos controlos
 (C), submetidos a restrição alimentar (RA) e alimentados com dieta hipoproteica (RP). C
 vs RA e RP, $P < 0,0002$; RA vs RP, $P < 0,05$.

restrição alimentar em relação ao dos animais controlos. Por outro lado, ao
 comparar os animais alimentados com dieta hipoproteica com os submetidos a
 restrição alimentar verifica-se uma redução igualmente significativa (7%) do
 número destes neurónios.

2.2. Neurónios trkB-positivos

A ANOVA mostrou que as variações encontradas no número total de
 células granulares da fásia denteada trkB-imunoreactivas entre os diferentes
 grupos experimentais não são dependentes do factor dieta ($F_{2,12} = 7,45$, $P = 0,08$).
 No entanto, a aplicação do teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou a existência
 de redução significativa (22%) no grupo de animais alimentados com dieta
 hipoproteica em relação ao dos controlos (Fig. 4). Não se observaram diferenças

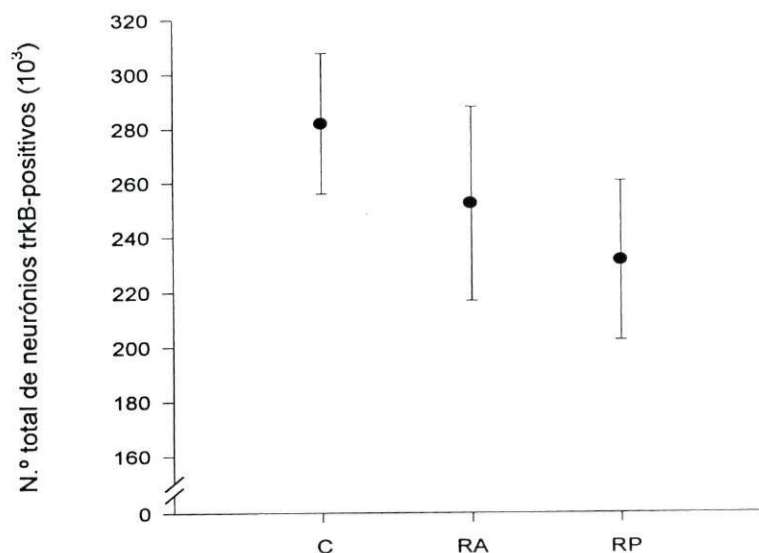


Figura 4. Representação gráfica do número total de células granulares da fáscia denteada TrkB-imunoreactivas, estimado nos grupos de ratos controlos (C), submetidos a restrição alimentar (RA) e alimentados com dieta hipoproteica (RP). C vs RP, $P < 0,005$.

significativas quando se estabeleceu comparação entre os grupos de animais controlos e submetidos a restrição alimentar.

3. Avaliação semi-quantitativa dos níveis de RNAm do BDNF e do trkB

Os resultados da avaliação semi-quantitativa dos níveis de RNAm do BDNF e do RNAm do trkB podem ser observados no Quadro 1.

Tanto os animais controlos como os submetidos a restrição alimentar apresentavam coloração muito intensa (+++) da região perinuclear e difusa no início dos seus dendritos (Quadro 1), quando foi avaliada a marcação para o RNAm do BDNF (Fig. 5A). Os animais alimentados com dieta hipoproteica apresentavam uma marcação ligeira ou moderada (+ / ++) na região perinuclear (Quadro 1) mas sem marcação nas partes proximais dos prolongamentos neuronais (Fig. 5B).

Figura 5. Fotografias de cortes coronais da camada granular (CG) da fásia denteada da formação do hipocampo em que se visualizam as diferentes intensidades de marcação do RNAm do BDNF e do trkB num animal controlo (A, C) e num submetido a restrição proteica (B, D). A – animal controlo onde se observa uma coloração intensa do RNAm do BDNF em numerosas células granulares da fásia denteada com um sinal muito forte na zona perinuclear; B – animal alimentado com dieta hipoproteica apresentando uma coloração menos marcada do RNAm do BDNF em relação ao controlo com sinal ligeiro a moderado na zona perinuclear das células granulares; C – animal controlo onde se observa marcação moderada do RNAm do trkB na zona perinuclear de muitos neurónios da camada granular; D – animal submetido a restrição proteica apresentando uma marcação ligeira do RNAm do trkB na zona perinuclear das células granulares. CM – camada molecular; H – hilo. Barras = 20 μ m.

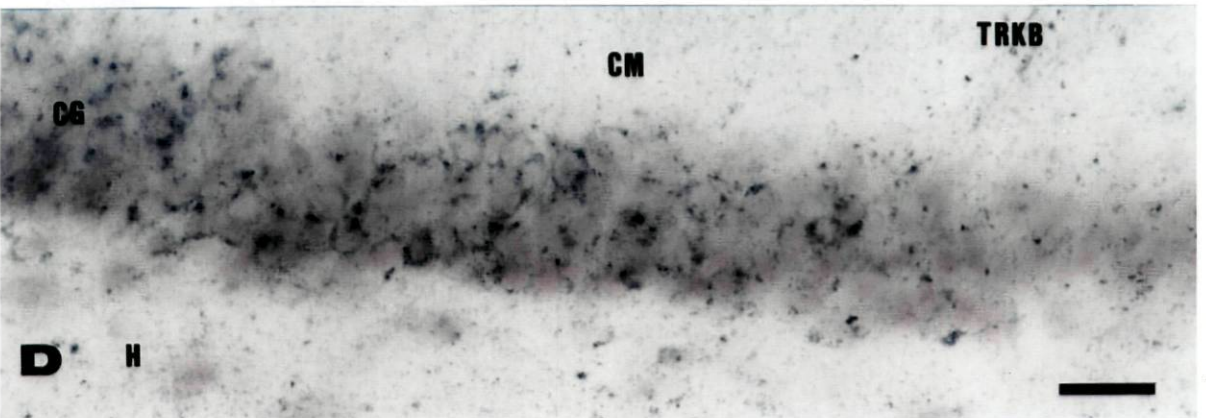
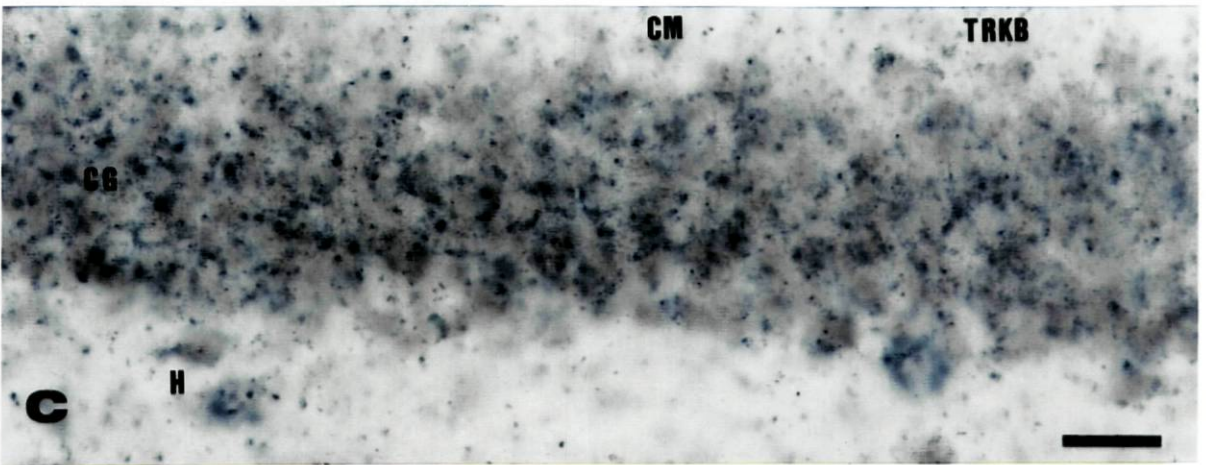
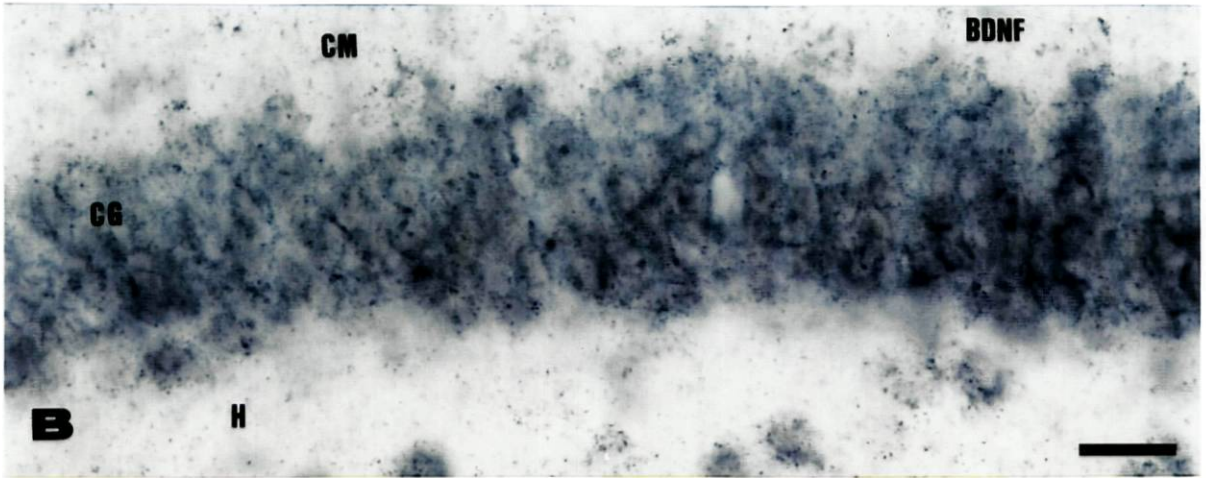
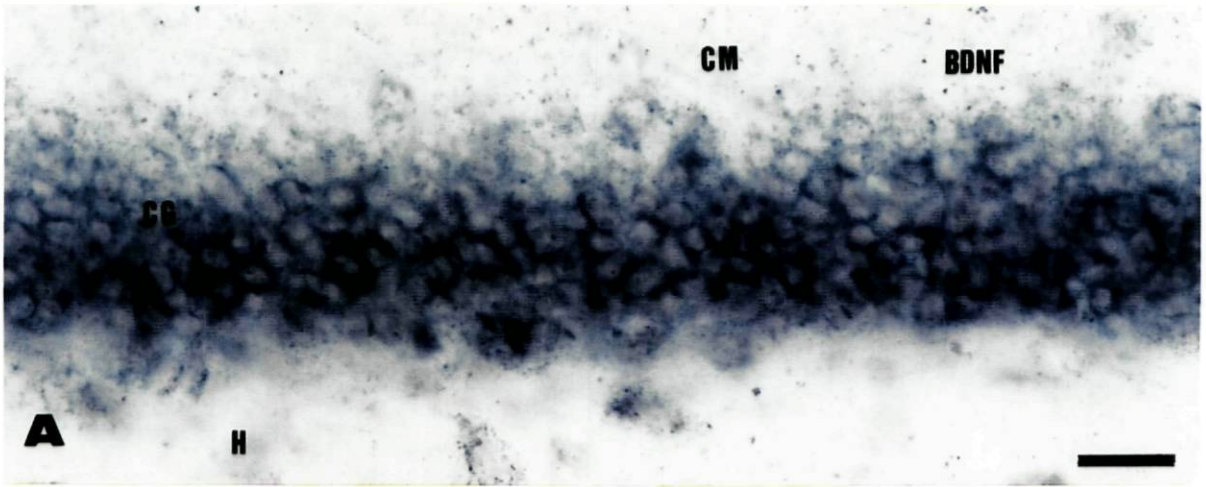


FIG. 5

Quadro 1

Avaliação semi-quantitativa do RNAm do BDNF e do RNAm do TrkB nas células granulares da fásia denteada da formação do hipocampo nos diferentes grupos experimentais.

	Controlos	Restrição Alimentar	Dieta hipoproteica
RNAm do BDNF	+++	+++	+ / +++
RNAm do trkB	++	++	+

0 para controlo, + para um sinal ligeiro de marcação perinuclear, ++ para um sinal moderado da zona perinuclear em células bem individualizadas e +++ para um sinal muito forte da zona perinuclear bem como da parte proximal dos neuritos celulares.

No respeitante à marcação para o RNAm do trkB, os animais controlo e submetidos a restrição alimentar (Quadro 1) apresentavam um aumento moderado da coloração perinuclear (++) (Fig. 5C) enquanto que os alimentados com dieta hipoproteica mostravam apenas uma ligeira coloração perinuclear (+) (Fig. 5D).

4. Testes comportamentais

4.1. *Open field*

A ANOVA demonstrou existência de efeito significativo da dieta na actividade locomotora quer na periferia ($F_{2,27} = 10,41$, $P < 0,0001$) quer na parte central da arena ($F_{2,27} = 1,96$, $P < 0,05$). O teste de Newman-Keuls revelou existência de aumento significativo da actividade locomotora na zona central nos

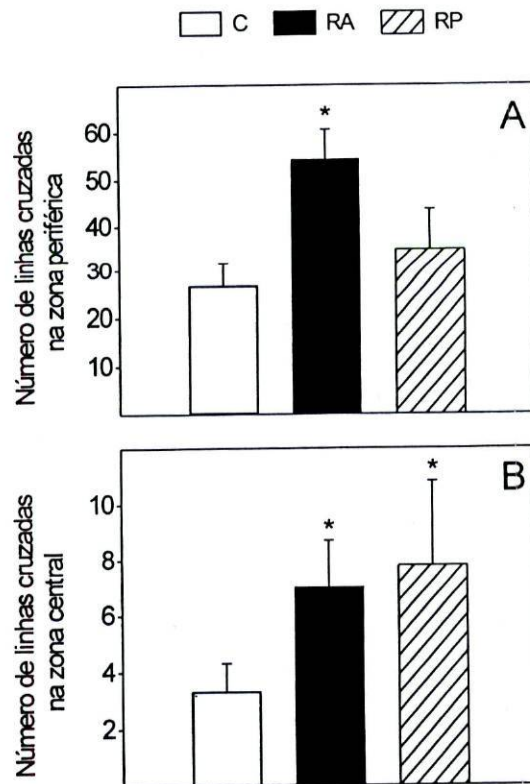


Figura 6. Representação gráfica da actividade locomotora dos animais dos grupos controlo, submetido a restrição alimentar e alimentado com dieta hipoproteica. A – Número médio de linhas cruzadas na zona periférica da arena. * Controlo vs Restrição alimentar, $P < 0,001$. B – Número médio de linhas cruzadas na zona central da arena. * Controlo vs Restrição alimentar e Restrição proteica, $P < 0,005$.

ratos submetidos a restrição alimentar e nos alimentados com dieta pobre em proteínas e da actividade locomotora na parte periférica do *open field* nos ratos submetidos a restrição alimentar (Fig. 6).

4.2. Passive avoidance

A ANOVA revelou existência de efeito significativo ($F_{2,27} = 4,54$, $P = 0,05$) do regime alimentar no tempo de latência até abandono da plataforma, avaliado no teste de retenção. A aplicação do teste de Newman-Keuls mostrou redução

deste tempo nos animais submetidos a restrição alimentar quando comparados com os controlos e os alimentados com dieta hipoproteica (Fig. 7).

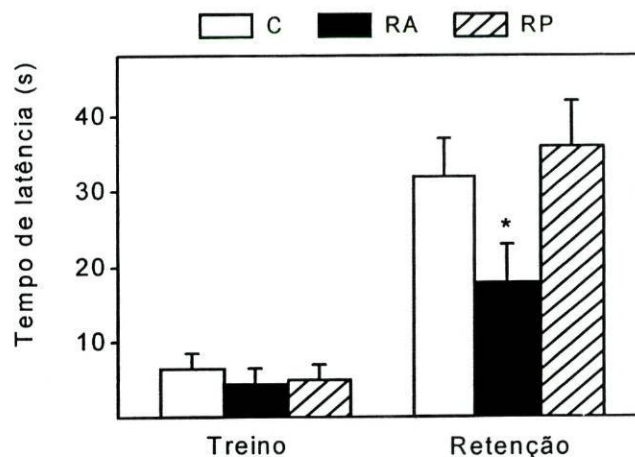


Figura 7. Representação gráfica do tempo de latência na prova do *passive avoidance* nos três grupos experimentais durante o período de treino e no teste de retenção. * Controlo vs. Restrição alimentar, $P < 0,05$.

É interessante realçar que enquanto os ratos controlos e os alimentados com dieta hipoproteica permaneciam imóveis na plataforma, os submetidos a restrição alimentar efectuavam numerosos movimentos de rotação e erguiam-se nas suas patas traseiras, por vezes caindo na grelha metálica ou saltando para as paredes de madeira. Esta actividade sugere que as alterações observadas neste teste podem ser devidas à sua hiperactividade.

4.3. Water maze

As distâncias médias percorridas pelos ratos para localização da plataforma na piscina e o número de vezes que cruzaram o local onde esta se encontrava previamente estão representados na Figura 8.

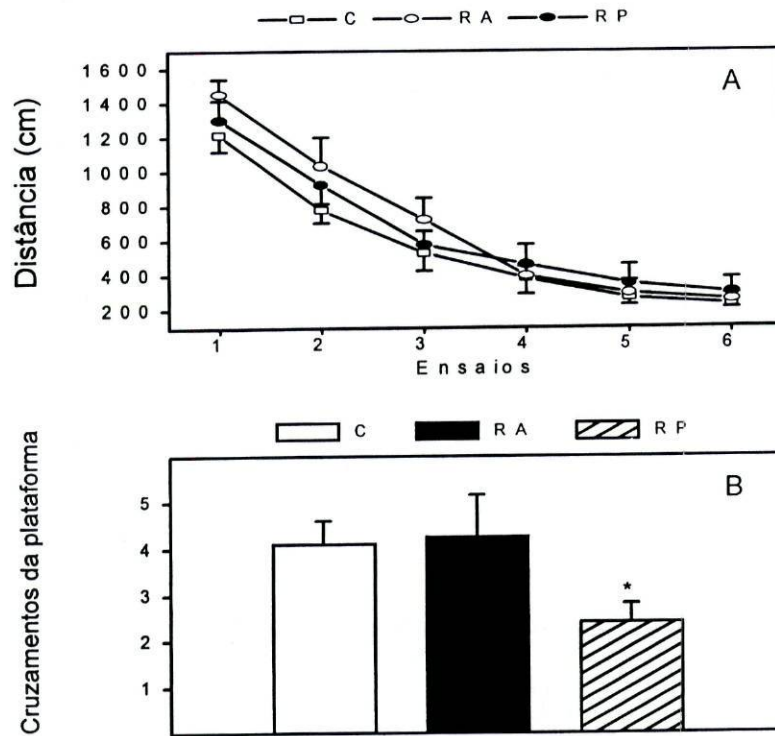


Figura 8. Desempenho dos animais controlos, submetidos a restrição alimentar e alimentados com dieta hipoproteica no teste *water maze*. A - Distância percorrida até atingir a plataforma escondida para cada conjunto de 4 ensaios consecutivos durante o período de treino. Não houve efeito significativo nas variações deste parâmetro. B - Número de vezes que os animais cruzaram o local onde se encontrava previamente a plataforma no *probe trial*. * Controlo vs. Restrição proteica, $P < 0,05$.

A análise estatística mostrou que todos os ratos de todos os grupos experimentais melhoraram progressivamente a sua aptidão para a localização da plataforma oculta ao longo dos 12 dias de ensaios correspondentes ao período de aquisição ($F_{5,135} = 26,80$, $P < 0,0001$).

A ANOVA revelou que existia efeito significativo da dieta no tempo de natação na periferia da piscina ($F_{2,27} = 5,82$, $P < 0,05$). O teste *post-hoc* demonstrou que os animais alimentados com dieta pobre em proteínas passavam mais tempo a nadar perto das paredes da piscina que os controlos ($P < 0,05$) e que os submetidos a restrição alimentar ($P < 0,05$).

Em relação ao ensaio sem a plataforma (*probe trial*), a ANOVA demonstrou efeito significativo da dieta nos cruzamentos da posição prévia da plataforma ($F_{2,27} = 9,58$, $P < 0,01$). O teste de Newman-Keuls revelou que os animais alimentados com dieta hipoproteica cruzavam a posição prévia da plataforma significativamente menos vezes que os controles ($P < 0.01$) e que os submetidos a restrição alimentar ($P < 0.01$) (Fig. 8).

A ANOVA mostrou não existir efeito do regime alimentar na distância percorrida pelos animais para encontrar a plataforma visível, demonstrando que os ratos de todos os grupos apresentavam condições motoras e sensoriais semelhantes.

DISCUSSÃO

A formação do hipocampo é uma região do cérebro vulnerável a grande número de agressões exógenas, nas quais se inserem as deficiências nutricionais (8,9,11-14,19,44,66-68). Nesta região existem várias neurotrofinas, bem como os seus receptores, cruciais para o crescimento, manutenção e regeneração neuronais (22,23).

De entre estas neurotrofinas destaca-se o BDNF já que é particularmente abundante na formação do hipocampo (52,69). Curiosamente, hoje em dia discute-se o papel do BDNF como mediador central na regulação do comportamento alimentar. De facto o BDNF também existe em abundância no hipotálamo, especialmente nos núcleos responsáveis pelo controlo da ingestão alimentar e suas repercussões no peso corporal. Foi demonstrado que a redução da quantidade deste peptídeo no hipotálamo causa aumento da actividade locomotora e da ingestão de alimentos (70) e que a sua administração intracerebroventricular provoca a supressão do apetite e, conseqüentemente, perda de peso (71). O BDNF tem ainda um papel regulador do metabolismo da glicose, modulando o balanço energético em ratos diabéticos (72).

Embora a identificação do BDNF como factor de crescimento tenha sido posta em evidência ao verificar-se o seu papel na sobrevivência dos neurónios dos gânglios dorsais de embrião de pinto (73), trabalhos mais recentes mostram que desempenha papel neurotrófico sobre numerosos tipos de neurónios do SNC entre os quais os colinérgicos do prosencéfalo basal e serotoninérgicos,

dopaminérgicos e GABAérgicos da formação do hipocampo e córtex entorrinal (74-80). A actividade biológica desta neurotrofina é mediada pela sua ligação a dois tipos de receptores, um de alta afinidade que pertence à família dos receptores da cinase da tirosina (trk) (81) e um de baixa afinidade que é o p75 (82,83). Dos três receptores da família trk, o trkA é específico para o *nerve growth factor* (NGF), o trkB é o receptor do BDNF e o trkC da NT-3, embora o trkA e o trkB possam também funcionar como receptores para a NT-3 e a NT-4/5 (84). Assim, o trkB é o único receptor da família trk que se liga ao BDNF e por isso o papel desta neurotrofina depende da capacidade de sinalização do complexo BDNF/trkB. Está demonstrado que ratos sem receptores trkB morrem algum tempo após o nascimento devido à sua incapacidade de ingerirem alimentos (85). Por outro lado a ausência do p75 provoca alterações comportamentais, nomeadamente défices de aprendizagem no *water maze* e na actividade motora (86). Este facto pode ser relacionado com o papel modulador do BDNF na plasticidade neuronal e na fisiologia sináptica que é importante na aprendizagem e memória (83,87). A apoiar esta hipótese tem sido demonstrado que os níveis de RNAm do BDNF estão particularmente elevados na formação do hipocampo de ratos após terem sido submetidos ao teste *water maze* (88,89,90).

No SNC, grandes quantidades de RNAm do BDNF foram encontradas na formação do hipocampo, amígdala e córtex cerebral (91-93). Na formação do hipocampo, a quantidade de RNAm do BDNF é mais elevada quando há grande actividade neuronal (94,95) e está diminuída em doenças neurodegenerativas do SNC (96). Na formação do hipocampo e córtex cerebral, os neurónios que expressam este tipo de RNAm também produzem a proteína correspondente (97-

99), que existe mais abundantemente na formação do hipocampo, especialmente na fásia denteada, na região do hilo e em CA3 (53).

O presente trabalho mostrou haver redução em cerca de 21% e 15% do número total de neurónios imunoreactivos para o BDNF da camada granular da fásia denteada nos ratos submetidos a privação proteica e restrição alimentar, respectivamente, em relação aos controlos. Foi também observada uma redução do RNAm do BDNF bastante evidente nos animais alimentados com dieta hipoproteica. Contudo, não se observaram diferenças no nível de RNAm do BDNF entre os animais submetidos a restrição alimentar e os controlos.

Os nossos resultados mostraram ainda a existência de uma diminuição de 22% do número total de células granulares trkB-positivas nos ratos submetidos a privação proteica quando comparados com os controlos. Não se verificou diminuição do número de células granulares trkB-positivas nos animais submetidos a restrição alimentar, talvez pelas diferentes formas de expressão que este receptor assume, pois além da sua forma completa (*full length*) pode existir com falta do domínio da cinase da tirosina, ou seja, forma incompleta ou truncada (100). Por outras palavras, o trkB tem maior amplitude de formas de expressão, sendo talvez por isso menos susceptível à diminuição da sua proteína (100). Por outro lado, os níveis de RNAm do trkB nos animais sujeitos a restrição alimentar eram semelhantes aos dos animais controlos. No entanto, nos animais alimentados com dieta hipoproteica apresentava uma redução dos seus níveis quando comparado com os controlos.

O nível das proteínas BDNF e trkB e dos seus RNAm nas células granulares dos ratos submetidos a restrição alimentar parece ser suficiente para a manutenção do número total desta população neuronal (19). Estes neurónios têm

a particularidade de continuar a sua neurogénese na vida adulta e são capazes de ser incorporados na camada granular e estabelecer conexões similares às efectuadas pelos neurónios já aí existentes (48,49,101). Estes novos neurónios parecem ser sensíveis às carências alimentares, visto que a malnutrição durante o período neonatal, quando a neurogénese das células granulares é muito elevada (8,9,46), provoca empobrecimento das suas arborizações dendríticas (8,9,44). Na mesma linha, foi também recentemente demonstrado que em animais adultos submetidos a restrição alimentar, as células granulares apresentam alterações subtis na estrutura das suas arborizações dendríticas traduzidas por aumento do comprimento dos seus segmentos terminais e do número de espinhas dendríticas nestes segmentos (19). É necessário salientar que os dendritos dos neurónios são o local de acção e libertação das neurotrofinas (23) pelo que qualquer alteração ao nível da estrutura da árvore dendrítica pode influenciar a actividade do BDNF e do trkB. Também o número de sinapses efectuadas na porção mais externa da camada molecular, que recebe a maior parte das aferências entorrinais (21), estava aumentada nos animais submetidos a restrição alimentar. Por outro lado, quer o comprimento dendrítico total das células granulares quer a área activa das sinapses na camada molecular externa estava inalterada (19). Tal facto sugere que, aparentemente, as células granulares mantêm intacta a sua capacidade de integração dos estímulos entorrinais aferentes que lhes chegam por fibras que fazem sinapse nos 2/3 externos das suas árvores dendríticas (21).

Outros estudos demonstram que ratos adultos submetidos a este tipo de dieta hipocalórica apresentam aumento da neurogénese dos neurónios da fásia denteada (36). No entanto, os estudos realizados com o nosso modelo de

restrição alimentar não detectaram alterações no número total de células granulares (19), o que demonstra manutenção do equilíbrio entre os mecanismos de morte e os de neurogénese destas células. Outros trabalhos empregando modelos de restrição alimentar (36,102,103) detectaram aumento do RNAm do BDNF nas células granulares da fásia denteada (36,103) que foi directamente relacionado com o aumento da neurogénese destas células. Os presentes resultados não mostram aumento do RNAm do BDNF e do trkB, tendo-se até observado redução ligeira do número de células granulares BDNF positivas nos animais submetidos a restrição alimentar. Esta diferença pode provavelmente ser explicada pelo facto daqueles trabalhos (36,102,103) serem efectuados em ratos submetidos a restrição alimentar durante 3 meses, enquanto que no modelo por nós utilizado este período foi de 7 meses. Podemos pois levantar a hipótese de que numa fase inicial da restrição alimentar as células granulares da fásia denteada aumentam os níveis de RNAm do BDNF e do trkB, aumentando também a síntese das respectivas proteínas. Este efeito protector do BDNF tem sido posto em evidência em várias situações experimentais. Assim, a indução de convulsões epilépticas provoca um aumento marcado da síntese desta neurotrofina (104), o que contribui para a redução da duração das convulsões (105). Igualmente, em situações de isquemia cerebral induzida experimentalmente foi demonstrado que a injeção intraventricular de BDNF previne a morte celular na região de CA1 da formação do hipocampo (106,107). Estes dados mostram que a formação do hipocampo responde às lesões, na sua fase aguda, com um aumento da síntese de BDNF de forma a proteger a sua integridade morfológica e funcional (108).

Num modelo de restrição alimentar de duração mais longa pode haver uma adaptação das células granulares, observando-se níveis normais de RNAm do BDNF e do *trkB* embora acompanhados de diminuição ligeira da síntese do BDNF e da manutenção do *trkB*, quando é feita a comparação com os ratos controlos. Aliás, esta adaptação dos animais traduzida por redução da síntese de neurotransmissores e neurotrofinas foi já relatada em situações de restrição calórica (109). Com efeito, a formação do hipocampo de ratos alimentados com dieta hipocalórica apresentava redução da concentração de dopamina, serotonina e noradrenalina (109).

Em relação aos ratos alimentados cronicamente com dieta hipoproteica, quer a redução do RNAm do BDNF e do *trkB* quer a diminuição acentuada do número de células granulares coradas imunocitoquimicamente com anticorpos contra o BDNF e contra o *trkB*, podem estar na base da morte neuronal que se observa na formação do hipocampo destes animais (14,15). Esta degenerescência das células granulares é também acompanhada de acentuadas alterações na estrutura das suas árvores dendríticas (14,15). Com efeito, existem evidências bem fundamentadas que sugerem que os processos neurodegenerativos são acompanhados muitas vezes de redução dos níveis neuronais de RNAm do BDNF e da sua proteína (102,110). Em geral, os factores neurotróficos protegem os neurónios através do aumento da síntese de proteínas que suprimem o *stress* oxidativo (enzimas antioxidantes e Bcl-2) (103,110-112,) e estabilizam as suas membranas através da acção sobre as enzimas quelantes de cálcio (103). As primeiras alterações degenerativas parecem surgir ao nível dos terminais axonais resultando em disfunção sináptica com activação de fenómenos de cascatas excitotóxicas e apoptóticas (110) que podem explicar a morte

observada nas principais populações neuronais do circuito unidireccional excitatório da formação do hipocampo (15,21).

O BDNF, como outros factores neurotróficos, também desempenha papel de relevo na plasticidade sináptica facilitando os fenómenos de aprendizagem e memória (103,113). Os presentes resultados comportamentais corroboram esta função do BDNF. Com efeito, analisando os dados obtidos no teste *water maze*, verifica-se que os ratos alimentados com dieta hipoproteica nadam distâncias mais longas que os controlos e muitas vezes em círculo na periferia da piscina. Está descrito que os ratos se sentem mais seguros junto à parede da piscina, o que pode ser devido à existência de elevados níveis de ansiedade. O mau desempenho dos ratos submetidos a privação proteica na *probe trial* do teste clássico do *water maze* pode revelar a existência de aprendizagem insuficiente durante o período de treino, devida igualmente a esta ansiedade. Contudo, esta interpretação não é compatível com os dados obtidos no *open field* que sugerem a existência de uma menor actividade emocional e redução da ansiedade nos ratos alimentados com dieta hipoproteica. Pode-se concluir com bastante certeza que os ratos deficientes em proteínas têm dificuldade em seguir uma estratégia adequada baseada na informação retida pela formação do hipocampo. Tal dificuldade aliada ao comportamento repetitivo dos animais, nadando em círculos à volta da piscina, podem ser consequência das numerosas alterações morfológicas descritas previamente na formação do hipocampo (12-14). A redução do número de células granulares imunoreactivas para o BDNF e para o *trkB*, bem como a diminuição dos níveis dos seus RNA's mensageiros, podem contribuir também para este défice na aprendizagem. No teste da plataforma visível do *water maze*, verificou-se que todos os animais tinham comportamento

semelhante, o que exclui o facto de existirem alterações sensoriais e motoras em consequência do regime alimentar que impedissem o bom desempenho dos animais.

Dada a plasticidade morfológica observada nos animais submetidos a restrição alimentar ao nível quer das arborizações dendríticas das células granulares da fáscia denteada quer nas principais sinapses estabelecidas pelos seus terminais axonais (19), seria plausível aceitar uma integração perfeita de todos os estímulos que chegam à formação do hipocampo provenientes das áreas neocorticais (21) e por isso a inexistência de alterações de comportamentos dependentes da integridade morfológica da formação do hipocampo. Na verdade, em todas as versões do teste *water maze* efectuadas, os ratos sujeitos a restrição alimentar apresentaram aprendizagem espacial semelhante à dos ratos controlos. No entanto apresentaram alterações noutros tipos de comportamento avaliados nos testes *open field* e *passive avoidance*, mostrando aumento de locomoção nas porções periférica e central da arena no *open field*, o que pode ser encarado como uma resposta emocional alterada perante estímulos novos. Contudo, também se pode encarar a hipótese de que esta alteração do comportamento esteja associado a um aumento de actividade motora e exploradora (114). Também os resultados obtidos no teste *passive avoidance* com estes animais podem ser encarados como consequência deste mesmo tipo de hiperactividade.

Pensa-se que a activação geral do comportamento dos ratos submetidos a restrição alimentar previamente descrita (114), tem importante valor adaptativo para a sobrevivência dos animais, já que pode reflectir a sua necessidade de adquirir e armazenar informações sobre o meio ambiente de maneira a proporcionar eficácia na pesquisa de alimentos (115).

Embora a natureza exacta destes efeitos comportamentais nos animais sujeitos a restrição alimentar seja desconhecida, pode estar relacionada com alterações a nível neuroquímico. Na verdade, foram descritas modificações nos níveis de serotonina e dos seus receptores (115), alterações nos sistemas opióide (116-118) e dopaminérgico (115,119), aumento da produção de citoquinas (120,121) e alterações na actividade dos eixos hipotalâmico-hipófise-suprarrenal/tiróide (122-125).

CONCLUSÕES

Em conclusão, os presentes resultados mostram que a restrição alimentar, no Rato, parece não causar grandes alterações nos níveis de BDNF e seu receptor trkB nas células granulares da fáscia denteada da formação do hipocampo, ao contrário da privação proteica que é responsável por redução significativa do número de neurónios imunoreactivos para o BDNF e para o trkB, acompanhada por diminuição dos respectivos RNAm. A nível comportamental, a restrição alimentar parece induzir nos animais um aumento da actividade motora ao contrário da privação proteica que é responsável por alterações acentuadas nos processos de aprendizagem e memória.

Embora se considere importante, a extrapolação dos resultados obtidos experimentalmente em modelos animais para o caso humano deve sempre rodear-se de um conjunto de precauções. Na verdade devem salvaguardar-se as diferenças entre as espécies e ter em conta as circunstâncias decorrentes das condições devidamente controladas a que os animais estão sujeitos ao contrário do homem no qual, para além das características inerentes ao próprio indivíduo, há que considerar a vasta complexidade de factores externos, incluindo os de índole social.

Assim, transpondo para o Homem os resultados obtidos com os modelos experimentais ensaiados, parece legítimo aceitar-se como vantajosa a prática de um regime alimentar de restrição calórica já que potencialmente pode retardar os processos de senescência bem como evitar ou diminuir o aparecimento de

diversas patologias com ele relacionadas. No entanto, há que ter em mente que dietas de restrição alimentar podem desencadear algumas perturbações comportamentais.

No caso da malnutrição proteica as consequências podem ser graves devido às alterações neuromorfológicas que acarretam traduzidas em perturbações cognitivas acentuadas com repercussões a nível social.

BIBLIOGRAFIA

1. Onuma Okezie O. World food security: the role of post harvest technology. *Food Technol* 1998;52:64-9.
2. FAO. 2000. Statistical database. Disponível no URL: <http://www.fao.org>.
3. Teixeira NS, Calheiros LJ, Aires PJ, Guerra AJ. Avaliação nutricional da população infantil (0-5 anos) de uma comunidade piscatória – Espinho. *Rev Port Ped* 1981;12:1-38.
4. Waterlow JC, Tonkiss AM, McGregor SM. Protein-energy malnutrition. 2nd ed. London: Edward Arnold; 1992.
5. Pelletier DL, Frongillo Jr. EA, Schroeder DG, Habicht J.-P. The effects of malnutrition on child mortality in developing countries. *WHO Bull* 1995;73:443-8.
6. McConnel P. Nutritional effects on non-mitotic aspects of central nervous system development. In: McConnel PS, Boer GJ, Romjin HJ, Van de Pool NE, Corner MA, editors. Adaptive capabilities of the nervous system. *Progress in Brain Research*. Vol 53. Amsterdam: Elsevier; 1980. p. 99-108.
7. Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes R, Hall J, et al. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav* 1978;2:137-230.

8. Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Galler JR. Malnutrition and the developing central nervous system. In: Isaacson RL, Jensen KF, editors. The vulnerable brain and environmental risks. Vol 1. New York: Plenum Press; 1992. p. 3-44.
9. Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993;17:91-128.
10. Paula-Barbosa MM, Tavares MA, Borges MM, Gray EG. Presynaptic inclusions in mossy fibre terminals of the cerebellar cortex following long-term undernutrition in adult rats. *J Neurocytol* 1984;13:841-7.
11. Paula-Barbosa MM, Andrade JP, Castedo JL, Azevedo FP, Camões I, Volk B, et al. Cell loss in the cerebellum and hippocampal formation of adult rats after long-term low-protein diet. *Exp Neurol* 1989;103:186-93.
12. Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Effects of long-term malnutrition and rehabilitation on the hippocampal formation of the adult rat. A morphometric study. *J Anat* 1995;187:379-93.
13. Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Evidence of reorganization in the hippocampal mossy fiber synapses of adult rats rehabilitated after prolonged undernutrition. *Exp Brain Res* 1995;104:249-61.
14. Andrade JP, Paula-Barbosa. Protein malnutrition alters the cholinergic and GABAergic systems of the hippocampal formation of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 1996;211:211-215.
15. Andrade JP, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Differential vulnerability of the subiculum and entorhinal cortex of the adult rat to prolonged protein deprivation. *Hippocampus* 1998;8:33-47.

16. Lukoyanov NV, Andrade JP. 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.
17. Yu BP, Masoro EJ, McMahan CA. Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J Gerontol* 1985;40:657-70.
18. Gould TJ, Bowenkamp KE, Larson G, Zahniser NR, Bickford PC. Effects of dietary restriction on motor learning and cerebellar noradrenergic dysfunction in aged F344 rats. *Brain Res* 1995;684:150-8.
19. Andrade JP, Lukoyanov NV, Paula-Barbosa MM. Chronic food restriction is associated with subtle dendritic alterations in granule cells of the rat hippocampal formation. *Hippocampus*, 2001; no prelo.
20. Paula-Barbosa MM, Andrade JP, Azevedo FP, Madeira MD, Alves MC. Lengthy administration of low-protein diet to adult rats induces cell loss in the hippocampal formation but not in the medial prefrontal cortex. *Soc Neurosci Abst* 1988;14:368.
21. Amaral DG, Witter MP. Hippocampal formation. *The rat nervous system*. 2nd Edition. San Diego: Academic Press; 1995. p. 443-93.
22. Steward O. Regulation of synaptogenesis through the local synthesis of proteins at the postsynaptic site. *Prog Brain Res* 1987;71:267-79.
23. Thoenen H. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 1991;42:235-8.
24. Winick M. Effects of malnutrition on the maturing central nervous system. *Adv Neurol* 1975;13:193-246.

25. Chamove AS. Dietary and metabolic effects on rhesus social behavior: protein and protein-calorie malnutrition. *Dev Psychobiol* 1980;13:287-98.
26. Portman OW, Neuringer M, Alexander M. Effects of maternal and long-term and postnatal protein malnutrition on brain size and composition in rhesus monkeys. *J Nutri* 1987;117:1844-51.
27. Jarrard LE. Selective hippocampal lesions and behavior. Implications for current research and theorizing. In: Isaacson I, Pribram KH, editors. *The hippocampus*. Vol 4. New York: Plenum Press; 1986. p. 93-186.
28. McCay C, Crowell M, Maynard L. The effect of retarded growth upon the length of life and upon the ultimate size. *J Nutr* 1935;10:63-79.
29. Masoro EJ. Food restriction in rodents: an evaluation of its role in study of aging. *J Gerontol* 1988;43:B59-B64.
30. Masoro EJ. Retardation of aging processes by food restriction: an experimental tool. *Am J Clin Nutr* 1992;55:1250S-2S.
31. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996;273:59-63.
32. Weindruch R. Caloric restriction and aging. *Sci Am* 1996;274:32-8.
33. Forster MJ, Lal H. Estimating age-related changes in psychomotor function: influence of practice and of level of caloric intake in different genotypes. *Neurobiol Aging* 1999;20:167-76.
34. Lynch CD, Cooney PT, Bennett SA, Thornton PL, Khan AS, Ingram RL, et al. Effects of moderate caloric restriction on cortical microvascular density and local cerebral blood flow in aged rats. *Neurobiol Aging* 1999;20:191-200.

35. Bruce-Keller AJ, Umberger G, McFall R, Mattson MP. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann Neurol* 1999;45:8-15.
36. Lee J, Duan W, Long JM, Ingram DK, Mattson MP. Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *J Mol Neurosci* 2000;15:99-108.
37. Campbell BA, Richardson R, 1988. Effects of chronic dietary restriction on sensory-motor function and susceptibility to stressor stimuli in the laboratory rat. *Exp Gerontol* 1988;23:417-27.
38. Harrison DE, Archer JR. Genetic differences in effects of food restriction on aging in mice. *J Nutr* 1987;117:376-82.
39. Faúndez V, Cordero ME, Rosso P, Alvarez J. Calibers and microtubules of nerve fibers: differential effect of undernutrition in developing and adult rats. *Brain Res* 1990;509:198-204.
40. Gill CJ, Rissman EF. Female sexual behavior is inhibited by short- and long-term food restriction. *Physiol Behav* 1997;61:387-94.
41. Leonhardt S, Shahab M, Luft H, Wuttke W, Jarry H. Reduction of luteinizing hormone secretion induced by long-term feed restriction in male rats is associated with increased expression of GABA-synthesizing enzymes without alterations of GnRH gene expression. *J Neuroendocrinol* 1999;11:613-9.
42. Resnick O, Morgane PJ, Hasson R, Miller M. Overt and hidden forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man. *Neurosci Biobehav Rev* 1982;6:55-75.

43. Resnick O, Morgane PJ. Animal models for small-for-gestational-age (SGA) neonates and infants-at-risk (IAR). *Dev Brain Res* 1983;10:221-5.
44. Cintra L, Díaz-Cintra S, Galván A, Kemper T, Morgane PJ. Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. *Brain Res* 1990;532:271-7.
45. Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with ³H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* 1980;190:87-114.
46. Bayer SA. Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and ³H-thymidine autoradiographic study. *Exp Brain Res* 1982;46:315-23.
47. Altman J, Bayer SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol* 1990;301:365-81.
48. Hastings KM, Gould E. Rapid extension of axons into CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* 1999;413:146-54.
49. Fuchs E, Gould E. In vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications. *Eur J Neurosci* 2000;12:2211-4.
50. McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:295-318.
51. Mattson MP, Duan W, Lee J, Guo Z. Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. *Mec Ageing Dev* 2001;122:757-78.

52. Yan Q, Radeke M, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein S. Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* 1997;378:135-57.
53. O'Keefe J, Nadel L. The hippocampus as a cognitive map. London: Oxford University Press;1978.
54. Alkon DL, Amaral DG, Bear MF, Black J, Carew TJ, Cohen NJ, et al. Learning and memory. *Brain Res Rev* 1991;16:193-220.
55. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Meth* 1984;11:47-60.
56. Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987;147:229-63.
57. Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa Rd, Ip NY, Belluscio L, de la Monte SM, et al. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* 1991;10:558-68.
58. Boris-Möler F, Kamme F, Wieloch T. The effect of hypothermia on the expression of neurotrophin mRNA in the rat hippocampus following transient cerebral ischemia in the rat. *Mol Brain Res* 1998;63:163-73.
59. Madeira MD, Sousa N, Santer RM, Paula-Barbosa MM, Gundersen HJG. Age and sex do not affect the volume, cell numbers, or cell size of the suprachiasmatic nucleus of the rat: an unbiased stereological study. *J Comp Neurol* 1995;361:585-601.
60. Madeira MD, Andrade JP, Lieberman AR, Sousa N, Almeida OFX, Paula-Barbosa MM. Chronic alcohol consumption and withdrawal do not induce cell

- death in the suprachiasmatic nucleus, but lead to irreversible depression of peptide immunoreactivity and mRNA levels. *J Neurosci* 1997;17:1302-19.
61. West MJ, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* 1990;296:1-22.
62. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991;231:482-497.
63. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 1984;134:127-36.
64. Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc* 1977;111:219-23.
65. Gundersen HJG, Jensen EBV, Kiêu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology – reconsidered. *J Microsc* 1999;193:199-211.
66. Cintra L, Granados L, Aguilar A, Kemper T, DeBassio W, Galler J, et al. Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus* 1997;7:184-91.
67. Cintra L, Aguilar A, Granados L, Galván A, Kemper T, DeBassio W, et al. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. *Hippocampus* 1997;7:192-203.
68. DeBassio W, Kemper TL, Tonkiss J, Galler JR. Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res* 1996;41:379-83.

69. Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *Eur Mol Biol Org J* 1990;9:2459-64.
70. Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *Eur Mol Biol Org J* 2000;19:1290-1300.
71. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Wellman CL. Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp Neurol* 1995;131:229-38.
72. Nakagawa T, Tsuchida A, Itakura Y, Nonomura T, Ono M, Hirota F, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates glucose metabolism by modulating energy balance in diabetic mice. *Diabetes* 2000;49:436-44.
73. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Eur Mol Biol Org J* 1982;1:549-53.
74. Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* 1990;5:297-306.
75. Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 1991;350:230-2.
76. Knusel B, Winslow JW, Rosenthal A, Burton LE, Seid DP, Nikolics K, et al. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:961-5.
77. Altar CA, Boylan CB, Jackson C, Hershenson S, Miller J, Wiegand SJ, et al. Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and

- nigrostriatal dopamine turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:11347-51.
78. Mamounas LA, Blue ME, Siuciak JA, Altar CA. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in the rat brain. *J Neurosci* 1995;15:7929-39.
79. Ventimiglia R, Mather PE, Jones BE, Lindsay RM. The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 1995;7:213-22.
80. Giehl KM, Tetzlaff W. BDNF and NT-3, but not NGF, prevent axotomy induced death of rat corticospinal neurons in vivo. *Eur J Neurosci* 1996;8:1167-75.
81. Barbacid M. Structural and functional properties of trk family of neurotrophin receptors. *Ann NY Acad Sci* 1995;766:442-58.
82. Isackson PJ, Huntsman MM, Murray KD, Gall CM. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron* 1991;6:937-48.
83. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 1995;270:593-8.
84. Chao NV. Neurotrophin receptors – a window into neuronal differentiation. *Neuron* 1992;9:583-93.
85. Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 1994;25:1386-1403.

86. Peterson DA, Dickinson-Anson HA, Leppert JT, Lee KF, Gage FH. Central neuronal loss and behavioral impairment in mice lacking neurotrophin receptor p75. *J Comp Neurol* 1999;404:1-20.
87. Lo DC. Neurotrophic factors and synaptic plasticity. *Neuron* 1995;15:979-81.
88. Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindefors N. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* 1992;138:153-6.
89. Kessler JP, So V, Choi J, Cotman CW, Gomez-Pinilla F. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav Neurosci* 1998;112:1012-9.
90. Ma YL, Wang HL, Wu HC, Wei CL, Lee EHY. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *Neuroscience* 1998;82:957-67.
91. Bahr BA, Staubli U, Xiao P, Chun D, Ji Z.-X, Esteban ET, et al. Arg-Gly-Asp-Ser selective adhesion and the stabilization of LTP: pharmacological studies and the characterization of a candidate matrix receptor. *J Neurosci* 1997;17:1320-9.
92. Fagan AM, Gage FH. Mechanisms of sprouting in the adult central nervous system: cellular responses in areas of terminal degeneration and reinnervation in the rat hippocampus. *Neuroscience* 1994;58:705-25.
93. Staubli U, Vanderklish P, Lynch G. An inhibitor of integrin receptors blocks long-term potentiation. *Behav Neural Biol* 1990;53:1-5.

94. Ballarin M, Ernfors P, Lindefors N, Persson H. Hippocampal damage and kainic acid injection induce a rapid increase in mRNA for BDNF and NGF in the rat brain. *Exp Neurol* 1991;114:35-43.
95. Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D. Activity regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *Eur Mol Biol Org J* 1990;9:3545-50.
96. Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, Winslow JW. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 1991;7:695-702.
97. Deckner ML, Frisen J, Verge VM, Hökfelt T, Risling M. Localization of neurotrophin receptors in olfactory epithelium and bulb. *Neuroreport* 1993;5:301-4.
98. Wetmore C, Cao Y, Petterson RF, Olson L. Brain-derived neurotrophic factor: subcellular compartmentalization and interneuronal transfer as visualized with anti-peptide antibodies. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:9843-7.
99. Wetmore C, Olson L, Bean AJ. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression and release from hippocampal neurons is mediated by non-NMDA type glutamate receptors. *J Neurosci* 1994;14:1688-1700.
100. Tokuyama W, Hashimoto T, Li YX, Okuno Hiroyuki, Miyashita Y. Highest trkB mRNA expression in the entorhinal cortex among hippocampal subregions in the adult rat: contrasting pattern with BDNF mRNA expression. *Mol Brain Res* 1998;62:206-15.

101. Markakis EA, Gage FH. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projection to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol* 1999;406:449-60.
102. Mattson MP. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res* 2000;886:47-53.
103. Mattson MP, Wenzhen D, Jaewon L, Zhihong Guo. Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment molecular mechanisms. *Mech Ageing Dev* 2001;122:757-78.
104. Murray KD, Isackson PJ, Eskin TA, King MA, Sylvia PM, Abraham LA, et al. Altered mRNA expression for brain-derived neurotrophic factor and type-II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in the hippocampus of patients with intractable temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 2000;418:411-22.
105. Binder DK, Croll SD, Christine MG, Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci* 2001;24:47-53.
106. Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A. Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:689-92.
107. Ferrer I, López E, Pozas E, Ballabriga J, Martí E. Multiple neurotrophic signals converge in surviving CA1 neurons of the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Comp Neurol* 1998;394:416-30.

108. Hicks RR, Numan S, Dhillon HS, Prasad MR, Seroogy KB. Alterations in BDNF and NT-3 mRNAs in rat hippocampus after experimental brain trauma. *Mol Brain Res* 1997;48:401-6.
109. Hao S, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM. Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur J Pharmacol* 2000;392:147-56.
110. Mattson MP, Keller JN, Begley JG. Evidence for synaptic apoptosis. *Exp Neurol* 1998;153:35-48.
111. Duan W, Guo Z, Mattson MP. Brain-derived neurotrophic factor mediates an excitoprotective effect of dietary restriction in mice. *J Neurochem* 2001;76:619-26.
112. Duan W, Lee J, Guo Z, Mattson MP. Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. *J Mol Neurosci* 2001;16:1-12.
113. Jankowsky JL, Patterson PH. Cytokine and growth factor involvement in long-term potentiation. *Mol Cell Neurosci* 1999;14:273-86.
114. Heiderstadt KM, McLaughlin RM, Wright DC, Walker SE, Gomez-Sanchez CE. The effect of chronic food and water restriction on open-field behavior and serum corticosterone levels in rats. *Lab Animals* 2000; 34:20-8.
115. Beck KD, Luine VN. Food deprivation modulates chronic stress effects on object recognition in male rats: role of monoamines and amino acids. *Brain Res* 1999;830:56-71.

116. Carr KD, Wolinsky TD. Chronic food restriction and weight loss produce opioid facilitation of perifornical hypothalamic self-stimulation. *Brain Res* 1993;607:141-8.
117. Carr KD. Feeding, drug abuse, and the sensitization of reward by metabolic need. *Neurochem Res* 1996;21:1455-67.
118. Cabeza de Vaca S, Carr KD. Food restriction enhances the central rewarding effects of abused drugs. *J Neurosci* 1998;18:7502-10.
119. Carlson JN, Herrick KF, Baird JL, Glick SD. Selective enhancement of dopamine utilization in the rat prefrontal cortex by food deprivation. *Brain Res* 1987;400:200-3.
120. Pahlavani MA. Does caloric restriction alter IL-2 transcription? *Front Biosci* 1998;3:125-35.
121. Zalcman S, Murray L, Dyck DG, Greenberg AH, Nance DM. Interleukin -2 and -6 induce behavioral-activating effects in mice. *Brain Res* 1998;811:111-21.
122. Armario A, Montero JL, Jolin T. Chronic food restriction and the circadian rhythms of pituitary-adrenal hormones, growth hormone and thyroid-stimulating hormone. *Ann Nutr* 1987;31:81-7.
123. Garcia-Belenguer S, Oliver C, Mormede P. Facilitation and feedback in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during food restriction in rats. *J Neuroendocrinol* 1993;5:663-8.
124. van Haasteren GA, Linkels E, von Toor H, Klootwijk W, Kaptein E, de Jong FH et al. Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *J Endocrinol* 1996;150:169-78.

125. McDonald MP, Wong R, Goldstein G, Weintraub B, Cheng SY, Crawley JN. Hyperactivity and learning deficits in transgenic mice bearing a mutant thyroid hormone beta 1 receptor gene. *Learn Mem* 1998;5:289-301.