



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO – POS NEURO – UFPE

RENATA VIRGÍNIA CAVALCANTI SANTOS

Desnutrição materna modifica fenótipo de neurônios e astrócitos e expressão de proteínas da matriz extracelular do córtex cerebral de ratos neonatos: uma abordagem *in vitro*.

Recife – PE
2015

RENATA VIRGÍNIA CAVALCANTI SANTOS

Desnutrição materna modifica fenótipo de neurônios e astrócitos e expressão de proteínas da matriz extracelular do córtex cerebral de ratos neonatos: uma abordagem *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento como requisito obrigatório para obtenção do Título de Mestre em Neurociências da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profa Dra Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Co-orientadora: Dra Catarina Sofia Gonçalves Pimentel

Recife, 25 de fevereiro de 2015.

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S237d Santos, Renata Virgínia Cavalcanti.
Desnutrição materna modifica fenótipo de neurônios e astrócitos e expressão de proteínas da matriz extracelular do córtex cerebral de ratos neonatos: uma abordagem *in vitro* / Renata Virgínia Cavalcanti Santos. – Recife: O autor, 2015.
88 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Desnutrição. 2. Fibronectina. 3. Lectinas. 4. Matriz extracelular. 5. Sulfato de Condroitina. I. Costa, Belmira Lara da Silveira Andrade da (Orientadora). II. Título.

612.665 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2015-117)

RENATA VIRGÍNIA CAVALCANTI SANTOS

Desnutrição materna modifica fenótipo de neurônios e astrócitos e expressão de proteínas da matriz extracelular do córtex cerebral de ratos neonatos: uma abordagem *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento como requisito obrigatório para obtenção do Título de Mestre em Neurociências da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profa Dra Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Co-orientadora: Dra Catarina Sofia Gonçalves Pimentel

Dissertação aprovada em 25/02/2015

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Sandra Lopes de Souza
Departamento de Anatomia - UFPE
1º Membro

Prof^a Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão
Departamento de Fisiologia – UFPE
2º Membro

Prof. Dr. Luciana Maria Silva de Seixas Maia
Departamento de Histologia – UFPE
3º Membro

Aos meus pais, que sempre me ensinaram que o conhecimento é o único bem que nunca poderão tirar de você.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele perdemos a fé até em nós mesmos.

Agradeço à minha mãe, Sandra Luna, por sempre estar presente, fazendo questão de participar de cada momento da minha vida, me dando amor e força para superar as adversidades.

Agradeço ao meu pai, Murilo Santos, pois onde o senhor estiver sei que seu amor e seus pensamentos estarão sempre comigo, me levando onde nem eu me acharia capaz de alcançar.

Agradeço à Professora Belmira Lara, com quem sonhei em trabalhar antes mesmo de conhecê-la, e mais ainda por toda a dedicação com que trabalha, pelas palavras de incentivo, além de todo o conhecimento o qual sempre está disposta a compartilhar.

Agradeço à Catarina Pimentel pela disposição em dividir suas próprias experiências, nos incentivando sempre a buscar mais e mais conhecimento.

Agradeço ao Professor Vivaldo Moura Neto, do Departamento de Anatomia da UFRJ, pela colaboração e incentivo.

Agradeço a toda minha família por sempre acreditarem nos meus sonhos, por mais incomuns que parecessem, especialmente à Andrea, Bruno, Beatriz, Sérgio Jr., Sérgio, Ricardo, Osana, Kleyton, Rachel, Lise, Sandrinha, Isabella e Juliana. À Maria de Souza, por todo amor.

Agradeço a todos os companheiros do Laboratório de Neurofisiologia da UFPE, Profº Marcelo, Giselle, Ricielle, Alinny, Emerson, Raone, Juliana, Thiago e Lucas, em especial, Eraldo, Igor, Maria Aparecida, Renata e Ubirakitan, pelos momentos de leveza no nosso dia a dia, além de toda a ajuda, paciência e companheirismo.

Agradeço a todos que compõem os Laboratórios de Biofísica das Membranas (Dpto. de Biofísica), de Fisiologia Renal (Dpto. de Fisiologia e Farmacologia) e de Biofísica Química (Dpto. de Biofísica) pela constante disposição em ajudar a desenvolver esse trabalho.

Agradeço a Fernando Queiroz, pela paciência e incentivo durante os quase dois anos de desenvolvimento deste trabalho, sempre me mostrando o lado positivo das dificuldades encontradas.

Agradeço a Polyana, Pablo, Maria Luiza, Thales, Flávia, Victor, Mariana, Millena, Rayssa, Marguerite, Rachel, Camila, Polyana, Karenn e Carolina pela amizade sincera desde o dia em que nos conhecemos e por toda torcida, apoio, amor e cumplicidade.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA = Ácido Araquidônico

CSPG = Proteoglicanos de Sulfato de Condroitina

DBR = Dieta Básica Regional

DHA = Ácido Docosaexaenoico

DIV = Dias *in vitro*

FB = Fibronectina

GFAP = Proteína Ácida Fibrilar Glial

MEC = Matriz Extracelular

MMP = Metaloproteinases de Matriz

PNN = Redes Perineuronais

PUFA = Ácidos Graxos Poliinsaturados

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais constituintes da matriz extracelular e redes perineuronais, suas origens e funções no tecido nervoso

Tabela 2. Efeitos de modelos de má-nutrição na composição da matriz extracelular

Tabela 3. Comparativo entre as composições da Dieta Comercial Labina e a DBR

Tabela 4. Comparativo entre a composição de ácidos graxos da Dieta Comercial Labina e da DBR

Tabela 5. Composição da DBR

Tabela 6. Composição dos géis SDS-PAGE

Tabela 7. Anticorpos utilizados no Western blotting

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes da matriz extracelular e células do tecido nervoso

Figura 2. Interação da fibronectina presente na MEC com o receptor de superfície celular integrina

Figura 3. Representação das moléculas de proteoglicanos individuais

Figura 4. Representação das redes perineuronais

Figura 5. Componentes da MEC e PNNs interagindo com receptores de superfície celular e alterando o comportamento celular a nível genético

RESUMO

Os astrócitos desenvolvem atividades essenciais para a sobrevivência e diferenciação dos neurônios. Uma dessas funções é produzir e secretar glicoproteínas que vão compor a matriz extracelular (MEC) e as redes perineuronais (PNNs), as quais têm papel fundamental no crescimento e ramificação dendrítica neuronais durante o desenvolvimento do sistema nervoso. Dados recentes do nosso laboratório demonstram que parâmetros morfo-funcionais dos astrócitos do córtex cerebral de ratos neonatos são alterados por um modelo de desnutrição materna multifatorial induzida pela dieta básica regional (DBR). Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que este tipo de desnutrição é capaz de alterar a expressão de moléculas da MEC em culturas primárias de astrócitos corticais, bem como o crescimento neurítico e a distribuição das PNNs, respectivamente, em co-culturas e culturas mistas de neurônios e células da glia. Ratas adultas receberam a DBR desde 30 dias antes do acasalamento até o final da gestação, enquanto ratas do grupo controle foram alimentadas com dieta comercial balanceada. A prole de ambos os grupos foi utilizada até o terceiro dia pós-natal para obtenção das culturas astrocitárias e mistas. Para o co-cultivo dos neurônios sobre astrócitos, foram utilizados embriões no 16º dia de gestação. As culturas de astrócitos e co-culturas foram mantidas em meio DMEM-F12 com 10% de soro fetal bovino e a cultura mista foi mantida em uma mistura composta por 50% de DMEM-F12 + 10% de soro fetal bovino e 50% de meio Neurobasal + 1% de soro B27. A análise quantitativa da expressão de fibronectina, importante componente da MEC, foi obtida por western blotting. O crescimento e complexidade das ramificações neuríticas, bem como indicadores moleculares de proliferação de astrócitos foram avaliados por imunocitoquímica para β -tubulina 3 e Ki67, respectivamente. A distribuição morfológica das PNNs foi avaliada através de imunocitoquímica para as lectinas *Wisteria floribunda* e *Vicia villosa*, bem como para o proteoglicano sulfato de condroitina-4. Os resultados mostraram que a desnutrição não modificou os níveis proteicos da fibronectina nas culturas de astrócitos mantidos *in vitro* por 20, 30 e 40 dias. No entanto, reduziu a presença das PNNs e do proteoglicano sulfato de condroitina-4 nas culturas mistas. A complexidade da arborização dos neurônios do grupo desnutrido ou normonutrido foi modificada quando os mesmos foram co-cultivados sobre astrócitos de neonatos com diferente condição nutricional. Porém, respostas adaptativas dos neurônios de animais desnutridos foram observadas quando os mesmos foram cultivados sobre astrócitos de grupo similar. Esses dados sugerem que alterações na reatividade fenotípica de neurônios e astrócitos de neonatos, induzidas pela desnutrição materna, envolvem modificações na expressão de componentes da MEC, principalmente de proteoglicanos e PNNs.

Palavras-chave: Desnutrição. Fibronectina. Lectinas. Matriz extracelular. Sulfato de Condroitina.

ABSTRACT

The astrocytes develop essential activities related to neuronal survival and differentiation. One of the main functions of astrocytes, is producing and releasing glycoproteins for extracellular matrix (ECM) and perineuronal nets (PNNs) composition, which have a critical role on neuritic outgrowth and neuronal dendritic branching, during development. Recent data of our laboratory show that a multifactorial maternal malnutrition model induced by the regional basic diet (RBD) alters astrocyte functional and morphological parameters in the cerebral cortex of neonates. In this context, the main purpose of this work was testing the hypothesis that this kind of malnutrition is able to modify the expression of ECM molecules in astrocyte primary cultures, as well as the neuritic outgrowth and the distribution of PNNs in co-cultures and neuron-glia mixed cultures of newborn cerebral cortex. Adult female rats were fed with RBD since 30 days before matching and during the gestation period, while the female rats from the control group were fed with a balanced commercial diet. The offspring from both groups were used until the third day post-natal for obtaining the astrocyte primary cultures and mixed cultures of neurons and astrocytes. For the co-cultures of neurons on astrocytes, the offspring used was from embryos of 16^o day of pregnancy. The astrocyte cultures and the co-cultures were maintained in DMEM-F12 medium supplemented with bovine fetal serum 10% and the mixed cultures were maintained with a mix constituted by 50% of DMEM-F12 medium supplemented with bovine fetal serum 10% and 50% of Neurobasal medium supplemented with B27 serum 1%. The quantitative levels of fibronectin were analyzed by western blotting. The neuritic outgrowth and branching complexity, as well as astrocyte proliferation were analyzed using beta-tubulin 3 and Ki67 as molecular markers, respectively. The morphological distribution of PNN was analyzed by immunocytochemistry to *Wisteria floribunda* and *Vicia villosa* agglutinins, as well as to chondroitin sulphate proteoglycan-4. The results suggest the maternal malnutrition did not modify fibronectin levels in cortical astrocytes in the early stage of their development. On the other hand, the PNNs and the chondroitin sulphate proteoglycan-4 were detected in lower number of cells in the mixed cultures as compared to the control condition. The neurite complexity of malnourished or well-nourished neurons was modified when they were cultivated on astrocytes from distinct nutritional condition. However, adaptive responses of neurons from malnourished pups were observed when they were cultivated on astrocytes from the same diet condition. These data suggest that alterations on neuronal and astrocyte phenotypic reactivity induced by maternal undernutrition may involve ECM modifications in the cerebral cortex of neonates. **Keywords:** Malnutrition. Fibronectin. Lectins. Extracellular matrix. Chondroitin Sulfate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR	14
1.1.1 FIBRONECTINA	14
1.1.2 PROTEOGLICANOS DE SULFATO DE CONDRITINA	16
1.1.3 REDES PERINEURONIAIS	17
1.2 EFEITOS DA MATRIZ EXTRACELULAR NA PROLIFERAÇÃO CELULAR	20
1.3 DESNUTRIÇÃO	22
1.3.1 EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO SOBRE COMPONENTES DO TECIDO NERVOSO	23
1.3.2 DIETA BÁSICA REGIONAL.....	25
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO ESTUDO.....	30
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 ANIMAIS	32
4.2 DIETA BÁSICA REGIONAL.....	32
4.3 CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS.....	35
4.4 CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS	35
4.5 CO-CULTURAS DE NEURÔNIOS SOBRE ASTRÓCITOS.....	36
4.6 IMUNOCITOQUÍMICA	36
4.7 WESTERN BLOTTING	37

5. RESULTADOS.....	39
5.1 Má-nutrição materna induziu respostas adaptativas nas interações neurônio-astrocítico favorecendo o crescimento neurítico	39
5.2 Má-nutrição modificou a composição da matriz extracelular e impediu a formação das redes perineuronais no córtex cerebral de ratos neonatos	51
6. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE 1. CAPÍTULO DE LIVRO	78
APÊNDICE 2. <i>IN VIVO</i> AND <i>IN VITRO</i> STUDIES OF THIOL - CAPPED CdTe AQUEOUS COLLOIDAL QUANTUM DOTS AS A TOOL FOR BRAIN TUMOR DIAGNOSTICS	86
ANEXO 1. APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	88

1. INTRODUÇÃO

Os astrócitos são participantes fundamentais de inúmeros processos no tecido nervoso, desde a vida embrionária orientando a localização dos neurônios e seus axônios, na sinaptogênese e funcionamento da sinapse quad-partite, como integrando e modulando, direta e indiretamente, as atividades neuronais no sistema nervoso (Kettenmann and Verkhratsky, 2008; Schafer, Lehrman and Stevens, 2013). Dentre estas e outras contribuições astrocíticas, uma delas, de extrema importância, é a produção e organização dos componentes da matriz extracelular (MEC) (Liesi, Dahl and Vaheri, 1983).

A MEC é uma rede composta de proteoglicanos e glicoproteínas entrelaçados, presente entre os neurônios e as células da glia (Figura 1). As principais glicoproteínas são a Fibronectina e a Laminina. Já os proteoglicanos são cadeias de glicosaminoglicanos ligadas covalentemente a um núcleo protéico específico (Frantz, Stewart and Weaver, 2010). É essencial perceber que esses constituintes são fundamentais para o desenvolvimento das próprias células gliais e neuronais e que os neurônios também participam da produção de alguns desses componentes da MEC (Celio *et al.*, 1998; Wiese, Karus and Faissner, 2012).

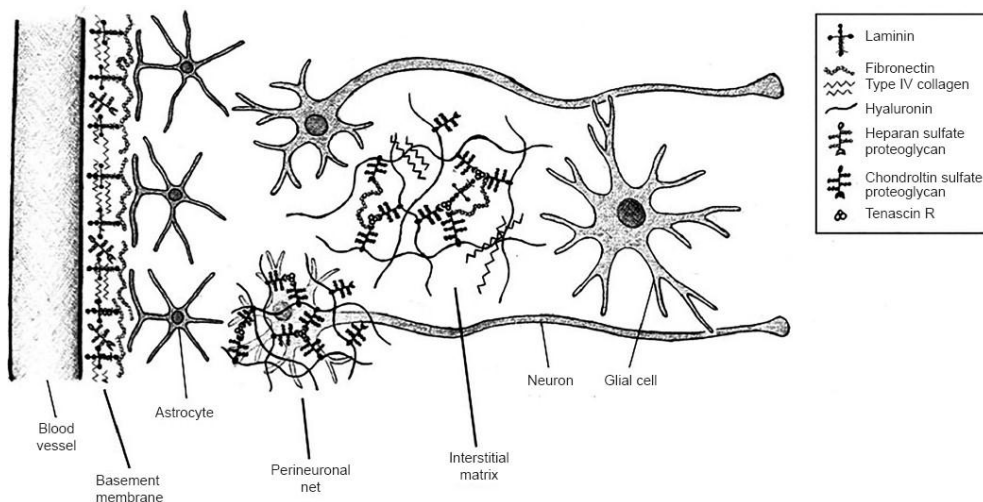


Figura 1. Componentes da matriz extracelular e células do tecido nervoso. (Ricks *et al.*, 2014).

Dentre as suas várias funções, a MEC atua regulando esse microambiente neural de modo finamente preciso, e de uma forma mais indireta, o desenvolvimento e a atividade neural no tecido nervoso, participando de processos envolvidos com a sobrevivência, formação morfológica, polaridade e comportamento celulares (Frantz, Stewart and Weaver, 2010; Tsang *et al.*, 2010; Wiese, Karus and Faissner, 2012).

Durante o desenvolvimento neuronal, a MEC passa por inúmeras mudanças a fim de dar suporte aos processos iniciais como a neurogênese, a gliogênese, a sinaptogênese, a migração e adesão celulares, além do crescimento e orientação axonais dos neurônios (Bergström *et al.*, 2014; Faissner *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2009; Meyer, Schmidt and Klämbt, 2014; Plantman, 2013). Na vida adulta, ela tem funções relacionadas à sobrevivência celular, plasticidade e respostas regenerativas (Frantz, Stewart and Weaver, 2010; Kwok, Carulli and Fawcett, 2010; Sykova, 2014; Tate, Tate and LaPlaca, 2007).

A remodelagem da composição da MEC é necessária para a poda sináptica, bem como para o estabelecimento de novas conexões e interações celulares. As Metaloproteinases de Matriz (MMPs) são uma família de endoproteinases dependentes de Zinco, que atuam diretamente sobre os constituintes da MEC (Figura 2) (Massova *et al.*, 1998). Atualmente, sabe-se que os mamíferos possuem 24 tipos de MMPs diferentes, sendo 6 das quais associadas a membranas celulares e o restante secretado. A ação das MMPs é regulada tanto a nível transcricional, quanto pela presença dos inibidores de metaloproteinases, sendo o equilíbrio entre os componentes da MEC, as MMPs e seus inibidores fundamental para a estabilidade do tecido (Kim, Turnbull and Guimond, 2011).

Abaixo, apresentamos alguns dos principais constituintes da MEC e suas funções no tecido nervoso.

1.1 COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR

1.1.1 FIBRONECTINA

A Fibronectina (FB) é uma glicoproteína presente na MEC, composta por duas subunidades de 250kDa ligadas por pontes dissulfeto e apresenta domínios específicos para ligações com outras proteínas da MEC, glicosaminoglicanos e receptores de superfície celular (Bradshaw and Smith, 2014). A FB é relacionada ao crescimento neurítico e axonal, tendo inclusive sua produção aumentada em indivíduos adultos que se encontram diante de situações de injúria e que requerem regeneração dos processos neuríticos do sistema nervoso periférico (Cohen *et al.*, 1987; Lefcort *et al.*, 2009).

No sistema nervoso central, a FB é mais encontrada durante a fase de desenvolvimento do tecido, continuando presente, só que em menor quantidade, no córtex cerebral e no hipocampo de indivíduos adultos. Em 2012, Tonge *et al.*, demonstraram, *in vitro*, que a FB é capaz de mediar o

crescimento neurítico e axonal de neurônios corticais e hipocâmpais através da integrina $\alpha_5\beta_1$ (Tonge *et al.*, 2012).

Além da presença no desenvolvimento, apesar de em menor expressão, no adulto, a FB também participa da regeneração dos sistemas nervosos central e periférico, como mostrado, por exemplo, por Tom *et al.*, que o bloqueio da ação da FB diminui profundamente o crescimento neurítico em um modelo de regeneração axonal na substância branca em animais adultos, dentre outros trabalhos que obtiveram resultados similares quanto à função regenerativa da FB em situações de lesão (Plantman, 2013; Tom *et al.*, 2004).

As integrinas são os principais receptores celulares das FBs, sendo compostas por inúmeras combinações de subunidades α e β , o que as capacita com variadas especificidades de ligações. Esses receptores desencadeiam cascatas de sinalização intracelulares, ativando quinases e potencializando os efeitos da interação celular, tais como a Integrina Ligada à Quinase - ILK, a Quinase de Adesão Focal - FAK e a Proteína Quinase C - PKC (Bixby, 1989; Plantman, 2013).

A Figura 2 ilustra como ocorre a interação entre a FB presente na MEC e as integrinas presentes na superfície celular, bem como entre as integrinas e proteínas do citoesqueleto, resultando na ação de proteínas da MEC dentro das células.

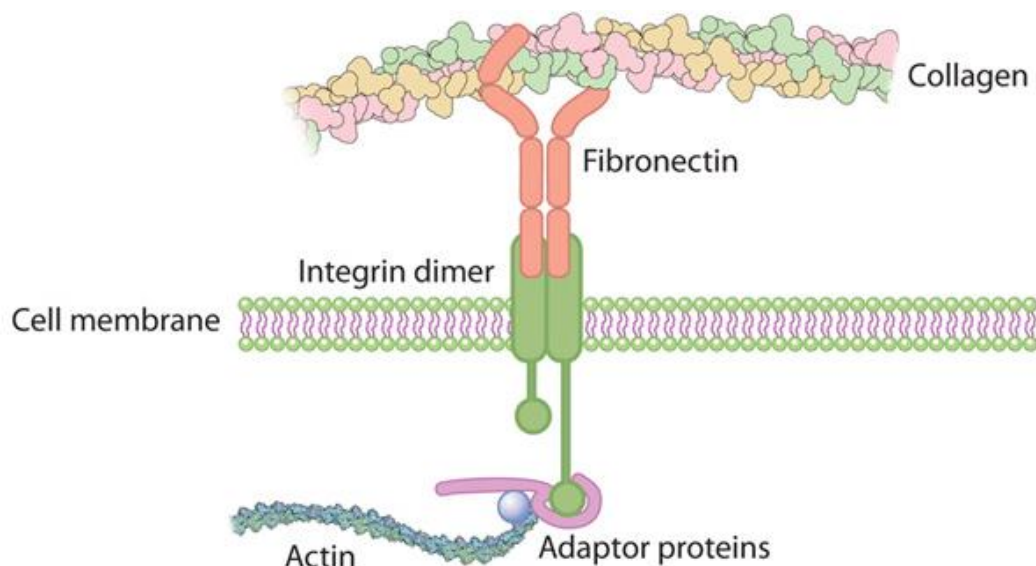


Figura 2. Interação da Fibronectina presente na MEC com o receptor celular Integrina, presente na superfície celular. Figura retirada do Livro online Essentials of Cell Biology, Nature Education.

1.1.2 PROTEOGLICANOS DE SULFATO DE CONDROITINA

Os proteoglicanos consistem de uma proteína central com uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos com um certo nível de sulfatação (Deepa *et al.*, 2006; Properzi, Asher and Fawcett, 2003). Dependendo da composição desses glicosaminoglicanos, os proteoglicanos são classificados em sulfatos de heparano, sulfatos de dermatano, sulfatos de queratano e sulfatos de condroitina (CSPGs), sendo este último um dos objetos de nosso estudo (Figura 3).

Vários tipos de CSPGs com distintos padrões de sulfatação (incluindo lecticanas, fosfacanas e NG2) contribuem para a composição das redes perineuronais (PNNs), uma MEC mais especializada nas atividades neuronais, as quais serão melhor descritas no subtópico seguinte (Bartus *et al.*, 2012) (ver 2.1.3).

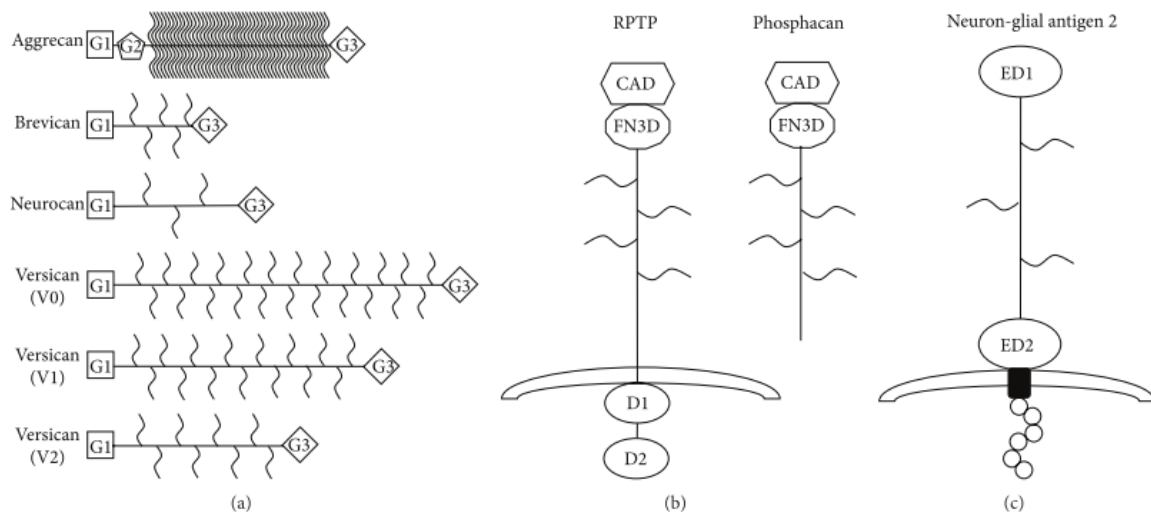


Figura 3. Representação das moléculas de proteoglicanos individuais. (a) Membros da família das Lecticanas. (b) Membros da família das Fosfacanas. (c) Membros da família do Antígeno Neurônio-glia 2 (NG2), um proteoglicano transmembranar. (Siebert, Conta Steencken and Osterhout, 2014).

O surgimento dos CSPGs se inicia nos períodos iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso central, quando começam a se formar as PNNs, mas declina gradualmente ao longo da maturação fisiológica do indivíduo, podendo reaparecer após situações de injúria ao tecido (Galtrey and Fawcett, 2007; Shen, 2014; Wang and Fawcett, 2012).

Ao longo do desenvolvimento os CSPGs podem se apresentar em diferentes funções no tecido nervoso, por exemplo, enquanto inicialmente os CSPGs estão envolvidos com o crescimento e orientação neurítica e axonal, no adulto, numa condição de regeneração tecidual, eles inibem o crescimento dos processos neuronais (Carulli *et al.*, 2005; Siebert, Conta Steencken and Osterhout, 2014). Mas em geral, as principais funções dos CSPGs na MEC cerebral são relacionadas com neuroproteção, bem como com a formação e manutenção das redes neurais, além de também estar envolvido com homeostase, morfogênese tecidual, sinalização de fatores de crescimento e divisão celular (Carulli *et al.*, 2005; Coles *et al.*, 2012; Ohtake and Li, 2014; Parfenova *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2008; Sugahara *et al.*, 2003).

1.1.3 REDES PERINEURONAIS

Essas estruturas foram primeiramente descritas por Camillo Golgi, em 1873, quando ele as visualizou com uma marcação de precipitado de prata, e só após alguns anos, foram denominadas Redes Perineuronais (Celio *et al.*, 1998). Atualmente, a visualização das PNNs é feita através de anticorpos que se ligam a partes específicas de alguns componentes ou pela ligação seletiva com aglutininas oriundas da *Wisteria floribunda*, *Vicia villosa* e soja, pois as lectinas dessas plantas se ligam com alta afinidade a terminais de resíduos N-acetilgalactosaminas (Karetko and Skangiel-Kramska, 2009; Sonntag *et al.*, 2015).

Sua formação e maturação dependem da atividade neuronal (Qing-long, Qian and Xiao-hui, 2014). Durante o amadurecimento do tecido nervoso, no fim do desenvolvimento pós-natal, quando a sinaptogênese, o refinamento sináptico e a mielinização já estão em fase final, alguns componentes da MEC se acumulam em torno das sinapses dendríticas e somáticas neuronais, formando as PNNs (Soleman *et al.*, 2013; Sonntag *et al.*, 2015; Wang and Fawcett, 2012).

As PNNs são estruturas reticulares, consideradas como uma MEC especializada, sendo importantes reguladores da plasticidade sináptica, estabilizando as conexões neuronais e restringindo o crescimento de axônios e dendritos, e assim, a capacidade plástica neuronal (Figura 4) (Qing-long, Qian and Xiao-hui, 2014; Wang and Fawcett, 2012). Em situações de injúria, elas são inibidoras do crescimento neurítico e da regeneração axonal, formando uma barreira em torno da cicatriz glial (Dou and Levine, 1994; Karetko and Skangiel-Kramska, 2009).

Por terem muitos componentes de carga negativa, são ditas aniônicas, e seu controle do microambiente ocorre exatamente através da regulação da difusão de cátions (Karetko and Skangiel-Kramska, 2009). Mas além do envolvimento das PNNs na plasticidade, elas também são relacionadas a outras funções como neuroproteção, inclusive contra o stress oxidativo, concentração de fatores de crescimento em torno de alguns neurônios, estabilização sináptica e geração de um tampão para controle iônico do microambiente em volta dos neurônios (Celio *et al.*, 1998; Morawski *et al.*, 2004; Suttkus *et al.*, 2012).

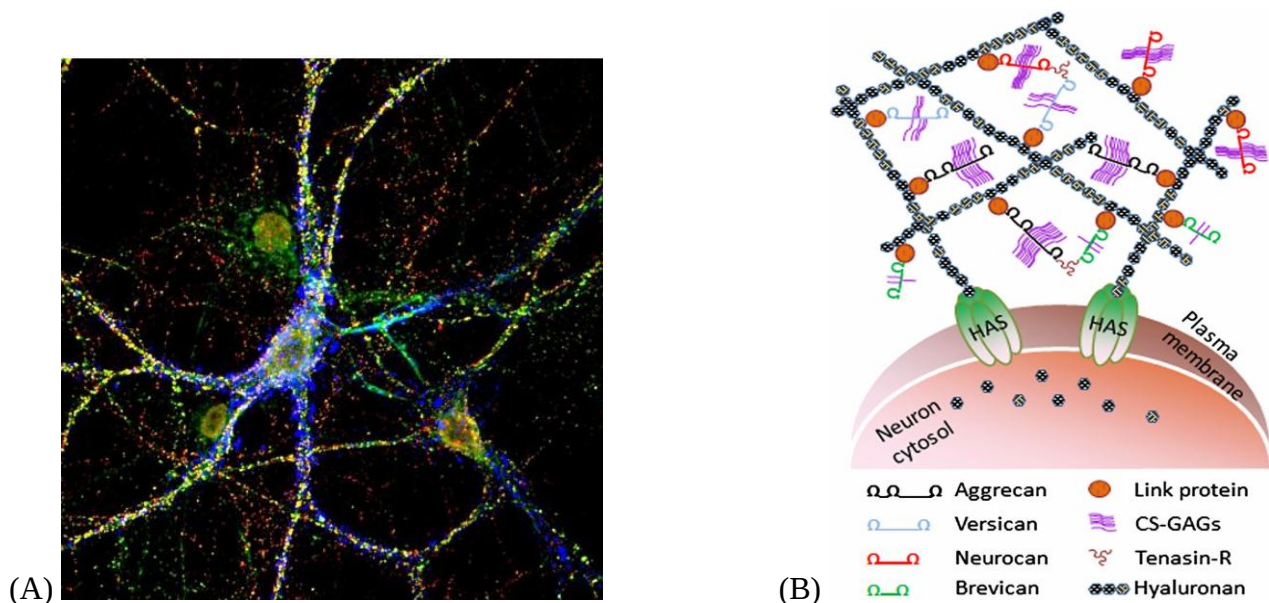


Figura 4. Representação das redes perineuronais. (A) Diferentes constituintes da rede perineuronal circundando a superfície celular neuronal no hipocampo (Geissler *et al.*, 2013). (B) Ilustração com alguns dos constituintes das redes perineuronais e as possíveis interações que podem fazer entre si e com os neurônios (Tsien, 2013).

Os componentes das PNNs já são detectados no sistema nervoso de neonatos, mesmo antes da formação das próprias redes. Dentre os principais temos o Ácido Hialurônico, as Tenascinas, as Proteínas de Ligação ou Adesão e os Proteoglicanos de Sulfato de Condroitina, descritos acima, os quais se ligam às Lectinas e ao Ácido Hialurônico e formam as Lecticanas, representadas pelas Versicanas, Neurocanas, Brevicanas e Agrecanas, dentre outras (Barros, Franco and Müller, 2011; Cavalcante *et al.*, 2002; Cua *et al.*, 2013; Czopka *et al.*, 2009; John *et al.*, 2006; Morawski *et al.*, 2012; Rauch, Feng and Zhou, 2001; Smith-Thomas *et al.*, 1994; Wang and Fawcett, 2012).

É essencial salientar que, conforme ocorre com a MEC, a composição das PNNs também é extremamente mutável tanto na sua formação, quanto na sua degradação (Carulli *et al.*, 2006).

Variações nos níveis das enzimas que a degradam influenciam sua produção e presença em torno dos neurônios, e assim, regulam a função de controle plástico dos mesmos (Kwok *et al.*, 2011). MMPs e Condroitinases degradam componentes das PNNs, sendo responsáveis pelo equilíbrio no controle rígido da plasticidade diante de um estado de injúria ou dos estados saudáveis.

Por exemplo, a ação da FB, presente na MEC, em promover o crescimento neurítico, é oposta à ação dos CSPGs, os quais, inibem o crescimento neurítico. Assim, a atuação das enzimas que degradam cada um dos componentes da MEC e das PNNs é fundamental para que as células nervosas se desenvolvam e atuem adequadamente (Cua *et al.*, 2013).

A Figura 5 ilustra as possíveis interações que ocorrem entre os diferentes componentes da MEC e das PNNs e os diversos receptores de superfície celular.

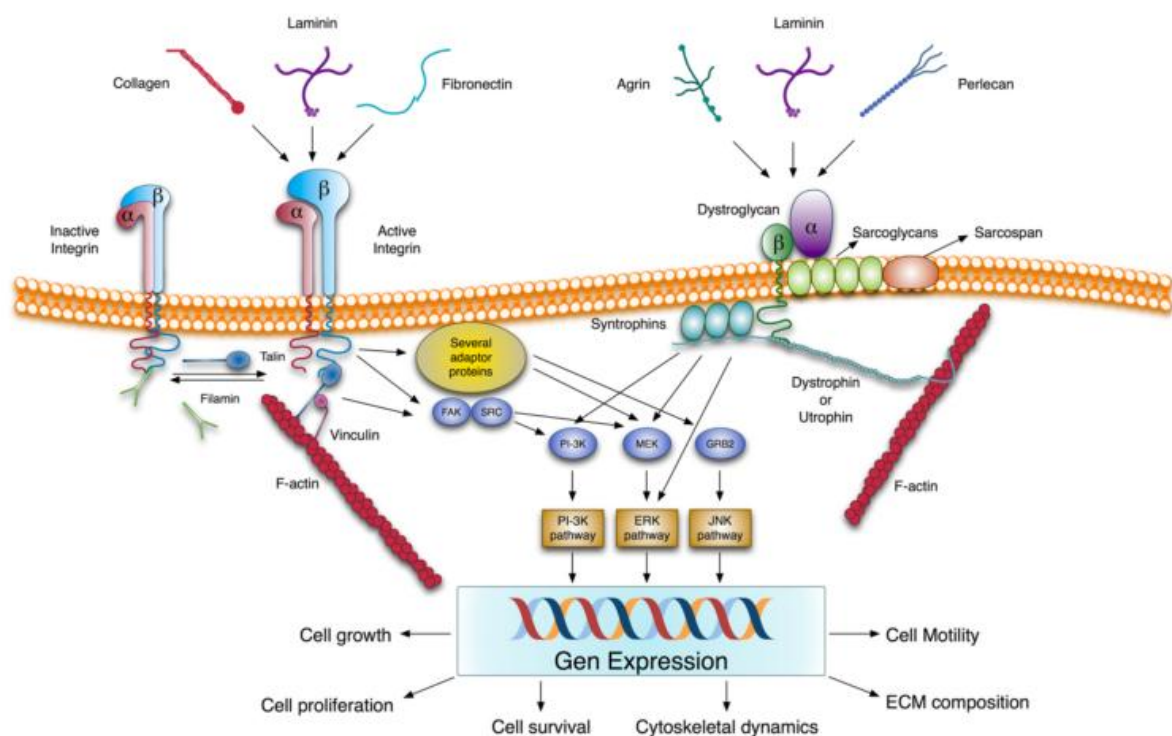


Figura 5. Componentes da MEC e PNNs interagindo com os receptores de superfície celular e alterando o comportamento celular a nível genético (Barber *et al.*, 2014).

A seguir, a tabela 1 resume as principais funções e características dos componentes da MEC e das PNNs.

Componentes	Origem	Funções
Laminina	Astrocitária	Participa da organização e estabilização da MEC; Atua no crescimento neurítico; Promove diferenciação, proliferação e migração celular.
Fibronectina	Astrocitária	Promove crescimento neurítico e axonal no tecido em desenvolvimento; Participa da regeneração axonal no indivíduo adulto; Ativa a microglia em estados de injúria; Envolvido na proliferação celular.
Ácido Hialurônico	Neuronal	Promove a formação densa de agregados das PNNs, permitindo o ancoramento de outros componentes na superfície neuronal.
Proteoglicanos de Sulfato de Condroitina	Astrocitária	Participam da formação da cicatriz glial, reprimindo a regeneração axonal e o crescimento neurítico.
Brevicanas	Astrocitária e Neuronal	Contribuem para a plasticidade do tecido nervoso, sendo um importante substrato para MMPs.
Neurocanas	Neuronal	Modulam as interações celulares e crescimento neurítico.
Agrecanas	Astrocitária	Regulam a plasticidade neural e forma a estrutura quaternária da MEC.
Proteínas de Adesão	Neuronal	Promovem a estabilidade da MEC.
Tenascina C	Neuronal	Participa da neurogênese.
Tenascina R	Oligodendrocitária	Participa da formação da mielina.

Tabela 1. Principais constituintes da MEC e PNNs, suas origens e funções no tecido nervoso.

1.2 EFEITOS DA MATRIZ EXTRACELULAR NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para um tecido apresentar sua forma e estrutura ideais é necessária a participação dos componentes da MEC e das PNNs interagindo com as células pelas quais foram produzidos, com o propósito de estimular a coesão e a função celular e manter o arcabouço físico tecidual. Dessa forma, a MEC tem um papel sinalizador essencial na construção do tecido, alternando entre estados passivos e ativos ao influenciar comportamentos celulares, tal como a proliferação celular.

Dessa forma, a MEC pode modificar o comportamento celular por 3 mecanismos: através da composição da própria MEC, incluindo não só a variedade dos componentes, mas a expressão das diversas formas individuais que os componentes podem apresentar; através do armazenamento e liberação de fatores de crescimento, fatores inibitórios e as moléculas da MEC; e pela interação com receptores de superfície celular (Adams and Watt, 1993; Mendes de Aguiar *et al.*, 2002; Rozario *et al.*, 2009).

Nesse contexto de efeitos sobre o comportamento celular, alguns trabalhos que estudaram os efeitos da MEC sobre alguns componentes e processos celulares em vários tecidos são apresentados a seguir.

Ainda em 1987, Goetschy *et al.*, mostraram que culturas astrocíticas sobre substratos de FB tiveram sua capacidade proliferativa mais desenvolvida do que as culturas cultivadas sobre substratos de colágeno e as do grupo controle (Goetschy *et al.*, 1987). Sottile *et al.*, verificaram que células embrionárias de camundongos não produtores de FB endógena apresentaram crescimento por adesão celular 2 a 5 vezes maior ao receber FB exógena nas culturas, do que as células que não receberam FB, demonstrando um dos papéis moduladores do comportamento celular por essa glicoproteína (Sottile, Hocking and Swiatek, 1998).

Gu *et al.*, em culturas primárias de células progenitoras neurais embrionárias, mostraram que CSPGs estão relacionados a processos como proliferação, migração e diferenciação celulares, sendo moléculas também fundamentais para o desenvolvimento e regulação do comportamento celular (Gu *et al.*, 2009). Em 2013, Tucker *et al.*, demonstraram, que a Tenascina-C é capaz de aumentar a proliferação de células-tronco CD34+ *in vitro*. No mesmo experimento, eles também utilizaram a Tenascina-W, que anteriormente, havia induzido a proliferação celular de osteoblastos *in vitro*, demonstrado então por Meloty-Kapella *et al.*, contudo a mesma não teve os resultados obtidos pela Tenascina-C (Meloty-Kapella *et al.*, 2008; Tucker *et al.*, 2013).

Demais *et al.*, ao estudar os efeitos de vários componentes da MEC em culturas de osteoblastos, viram, por exemplo, que a FB e o Colágeno Tipo I foram mais importantes para a adesão celular, já a partir dos primeiros 60 minutos de cultivo, do que outros constituintes como a Vitronectina e a Poly-L-Lysina (Demais *et al.*, 2014). Sevilla *et al.*, evidenciaram que a FB tem papel crucial na proliferação celular de fibroblastos em um modelo de cultura de células em micro tecido 3D, o qual é composto por um substrato de colágeno tipo I polimerizado com fibrilas de FB e onde a quantidade e a presença de FB pôde ser cuidadosamente controlada. Eles mostraram que na

ausência da FB os fibroblastos não proliferaram de modo significativo, bem como quando um bloqueador da FB (R1R2) foi adicionado à cultura. Já quando a FB estava presente no modelo de cultura celular, juntamente com o colágeno, a proliferação dos fibroblastos foi compatível com culturas controle (Sevilla, Dalecki and Hocking, 2013).

Mais recentemente, Chen *et al.*, através de um modelo de matriz para culturas celulares, demonstraram que células vasculares musculares lisas de aorta de ratos proliferaram 2,4 vezes mais em presença de FB, do que na condição sem FB (Chen, Lin and Tang, 2014). Kalkreuth *et al.*, evidenciaram que a FB foi capaz de estimular proliferação e migração de células progenitoras mesenquimais, mas não a diferenciação das mesmas, *in vitro* (Kalkreuth *et al.*, 2014). Por outro lado, Stoffels *et al.*, observaram que a FB foi capaz de mediar a proliferação, mas não a migração, de células progenitoras de oligodendrócitos em um modelo de desmielinização (Stoffels *et al.*, 2015).

1.3 DESNUTRIÇÃO

A nutrição pode ser definida como um conjunto de processos orgânicos que englobam a alimentação, digestão, absorção e metabolismo. Para o desenvolvimento e organização funcional dos diversos sistemas do nosso organismo, e especialmente do sistema nervoso, é fundamental que o corpo receba uma nutrição satisfatória qualitativa e quantitativamente (Georgieff, 2007; Prado and Dewey, 2014).

Durante a gestação e o aleitamento, o desenvolvimento do sistema nervoso ocorre rápida e intensamente através dos processos da neurogênese, gliogênese, migração, diferenciação celular, e mielinização (Montanha-Rojas *et al.*, 2005; Prado and Dewey, 2014; Salas *et al.*, 2012). Assim, neste período crítico, o tecido neural está mais vulnerável a vários tipos de agressões, sejam nutricionais ou mesmo devido a algum stress, exposição a substâncias tóxicas ou infecção impostas à mãe (Rice and Barone, 2000; Richetto and Riva, 2014). As repercussões, transitórias ou permanentes, são proporcionais ao tipo de nutriente em falta, à intensidade e à duração do período de má-nutrição à qual a criança ou a gestante foram submetidas, podendo reverter-se ou não com uma dieta apropriada (Benton, 2010; Morgane, Mokler and Galler, 2002; Rosales, Reznick and Zeisel, 2009; Rotta *et al.*, 2003).

Com efeito, a desnutrição infantil continua sendo um dos mais graves problemas sociais e de saúde pública do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil (Martins *et al.*, 2011). Segundo a última pesquisa da Fundação Abrinq - Save The Children, em fevereiro de 2012, 2,6 milhões de crianças com menos de cinco anos morrem todo ano por subnutrição e 170 milhões de crianças sofrem de desnutrição crônica no mundo (<http://sistemas.fundabrinq.org.br/biblioteca/acervo/RA2012.pdf>).

1.3.1 EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO SOBRE COMPONENTES DO TECIDO NERVOSO

A diversidade de efeitos provocados pela má-nutrição sobre o sistema nervoso vem sendo descrita por vários grupos de pesquisadores, com especial ênfase às repercussões transitórias ou permanentes, especialmente aquelas decorrentes de níveis inadequados de proteínas ou ácidos graxos essenciais na dieta ou aos efeitos de uma desnutrição caracterizada por restrição geral nos níveis de nutrientes e calorias (Levitsky and Barbara J. Strupp, 1995; Morgane, Mokler and Galler, 2002; Uauy and Dangour, 2006).

É bem estabelecido que a desnutrição materna durante a gestação pode modificar a competência do cérebro da progênie para manter a homeostase em condições desafiantes (Antonow-Schlorke *et al.*, 2011; Levitsky and Barbara J. Strupp, 1995; Spencer and Palmer, 2012). Embora alguns dos efeitos deletérios às células neurais possam ser reduzidos pela reposição nutricional a partir do aleitamento, outros podem persistir até a vida adulta como consequência de modificações epigenéticas (Jiménez-Chillarón *et al.*, 2012). Neurônios e oligodendrócitos são especialmente vulneráveis a diferentes tipos de má-nutrição fetal e/ou neonatal, enquanto astrócitos são geralmente mais resistentes a lesões nestas condições (Ranade *et al.*, 2012).

Gressens *et al.*, relataram que uma restrição proteica materna iniciada na gestação e prolongada pelas duas primeiras semanas de vida da prole provocou inúmeras anormalidades no desenvolvimento cerebral de roedores: astrocitogênese tardia, produção tardia de ácido hialurônico na matriz extracelular e diferenciação neuronal e sinaptogênese alteradas (Gressens *et al.*, 1997). Rotta *et al.*, utilizando também um modelo de restrição proteica durante os períodos de gestação e lactação, observaram alterações em parâmetros glutamatérgicos no córtex cerebral de ratos, caracterizados por uma diminuição no transporte de glutamato através da membrana plasmática, bem como uma diminuição da ligação do Glutamato dependente de Na⁺ às membranas

sinápticas, bem como uma redução na liberação vesicular deste neurotransmissor (Rotta *et al.*, 2003).

Há evidências de que a má-nutrição proteica (6 a 7% de caseína) durante os períodos pré e pós-natal é capaz de alterar o metabolismo e a morfologia neuronal em várias regiões cerebrais (Morgane, Mokler and Galler, 2002). Salas *et al.*, induziram um modelo de deficiência proteica pré-natal gradual e durante o aleitamento, no qual a quantidade de ração fornecida às mães era reduzida ao longo dos dias. Durante o aleitamento, o qual durou 25 dias, a má-nutrição continuou na medida em que os neonatos só podiam ser amamentados por 12 horas por dia. Os pesquisadores encontraram uma diminuição no número de ramos dendríticos e na arborização destes no córtex insular dos animais oriundos de gestantes desnutridas, aos 20 dias de vida da prole (Salas *et al.*, 2012).

Em relação à deficiência de micronutrientes, como a vitamina B1, observou-se alteração na neurogênese hipocampal de camundongos, quando os animais estavam a apenas 9 dias sob a dieta deficiente (Zhao *et al.*, 2008). Em outro trabalho, quando a deficiência ocorreu por 30 dias, foram observados reduzidos níveis de acetilcolina no córtex e no hipocampo, devido à participação da tiamina na síntese deste neurotransmissor (Pires *et al.*, 2005).

Fukui *et al.*, 2012 demonstraram que a deficiência em vitamina E em roedores, diminuiu a expressão de CRMP-2 (proteína mediadora de resposta à colapsina), uma proteína citoplasmática envolvida na orientação axonal no córtex cerebral e na área CA1 do hipocampo, assim como aumentou a expressão da proteína MAP-CL3, a qual é relacionada à degradação dos microtúbulos axonais, nessas mesmas regiões (Fukui *et al.*, 2012).

Em relação aos astrócitos, alguns estudos têm indicado que a má-nutrição proteica imposta às mães durante a gestação induz alterações transitórias logo após o nascimento, tais como, modificações fenotípicas e astrocitogênese precoce ou retardada em algumas regiões cerebrais da prole (Gressens *et al.*, 1997). Feoli *et al.*, por exemplo, relataram que astrogliose transitória ocorre no córtex cerebral, mas não no hipocampo ou cerebelo, aos dois dias de vida. Os mesmos autores também observaram reduzidos níveis de glutathione e da enzima glutathione peroxidase no córtex e hipocampo dos neonatos aos 2 dias, associado a uma menor reatividade antioxidante total (Feoli *et al.*, 2006). No entanto, a maior parte das alterações bioquímicas detectadas em astrócitos foram completamente recuperadas durante a maturação do cérebro, mesmo mantendo a dieta deficiente em proteínas até a idade adulta (Feoli *et al.*, 2006, 2008).

É bem conhecido que os astrócitos estão implicados diretamente no suporte metabólico aos neurônios, liberando fatores tróficos, moléculas antioxidantes e componentes da matriz extracelular (MEC) (Freeman, 2010; Kettenmann and Verkhratsky, 2008). Assim, modificações em seu metabolismo ou capacidade de reagir no início da vida pós-natal poderão comprometer o crescimento ou sobrevivência neuronal, bem como a função sináptica durante o período crítico de desenvolvimento cerebral (Wang and Bordey, 2008).

Ranade *et al.*, utilizando um modelo de deficiência protéica (7% de caseína) iniciado 6 semanas prévias ao período de acasalamento e continuada durante toda gestação, observaram na prole aos 14 dias, uma redução no número de células totais em todas as regiões cerebelares, sendo os efeitos observados na glia de Bergmann ou em astrócitos marcados para GFAP, revertidos por uma dieta balanceada a partir da idade de 28 dias (Ranade *et al.*, 2012).

No que concerne à MEC, os efeitos da desnutrição foram pouco estudados e os resultados são bastante específicos para a região analisada e para o período em que a má-nutrição foi induzida (Tabela 2). Reif *et al.*, (1993) estudaram os efeitos de uma restrição dietética perinatal durante a lactação na MEC do fígado e encontraram níveis de LN diminuídos, possivelmente devido ao seu papel na diferenciação celular final deste órgão (Reif *et al.*, 1993). Manojkumar e Kurup, em um modelo de desnutrição protéico-calórica em animais no período de amamentação, observaram um aumento na quantidade total de glicosaminoglicanos no cérebro, apesar de um aumento também na quantidade de enzimas relacionadas ao catabolismo dos proteoglicanos, a despeito de uma redução nos níveis dos carboidratos componentes das glicoproteínas (Manojkumar and Kurup, 1998).

Vituri *et al.*, analisaram a quantidade de proteínas da MEC na medula óssea em ratos adultos com desnutrição protéica e observaram que estes expressavam mais LN do que os animais do grupo controle, provavelmente alterando a rota de diferenciação celular na medula óssea, bem como a liberação de células diferenciadas da medula óssea para o sangue (Vituri *et al.*, 2000). Em 2007, Xavier *et al.*, também estudando os efeitos de uma má-nutrição protéica e energética na MEC da medula óssea de camundongos adultos, também verificaram um aumento na expressão de FB e LN, além de uma diminuição na proliferação celular neste órgão (Xavier *et al.*, 2007).

Referência	Tipo de restrição nutricional/órgão em estudo	Período da restrição nutricional	Efeitos no grupo experimental
(Reif <i>et al.</i> , 1993)	Restrição protéica / Fígado	Lactação	Níveis de Laminina reduzidos
(Manojkumar and Kurup, 1998)	Restrição protéico-calórica / Cérebro	Lactação	Níveis de glicosaminoglicanos e suas enzimas degradadoras aumentados Níveis dos carboidratos componentes das glicoproteínas reduzidos
(Vituri <i>et al.</i> , 2000)	Restrição protéica / Medula óssea	Fase adulta	Níveis de Laminina aumentados
(Xavier <i>et al.</i> , 2007)	Restrição protéico-calórica / Medula óssea	Fase adulta	Níveis de Laminina e Fibronectina aumentados Proliferação celular reduzida
(Swartz-Basile <i>et al.</i> , 2003)	Deficiência em Vitamina A / Intestino	Fase adulta	Níveis de Laminina reduzidos Proliferação e migração celulares reduzidas
(Aguilar <i>et al.</i> , 2008)	Deficiência em Vitamina A / Fígado	Fase adulta	Níveis de Laminina, Fibronectina e Colágeno tipo IV aumentados
(Esteban-pretel <i>et al.</i> , 2013)	Deficiência em Vitamina A / Pulmão	Fase jovem	Níveis de Colágeno tipo IV aumentados Níveis de Laminina e MMP-2 e MMP- 9 reduzidos
(Penedo <i>et al.</i> , 2009)	Deficiência em Triptofano / Retina	Lactação	Diminuição nos níveis de MMP-9 e na plasticidade axonal

Tabela 2. Efeitos de modelos de má-nutrição na composição da matriz extracelular.

Em 2003, Swartz-Basile *et al.*, observaram que uma dieta deficiente em vitamina A na vida adulta afetou a modulação da apoptose, proliferação e migração dos enterócitos e que estes efeitos se relacionaram com a composição da MEC enterocítica, a qual apresentou uma diminuição na

expressão da LN (Swartz-Basile *et al.*, 2003). Por outro lado, Aguilar *et al.*, em 2008, demonstraram que uma dieta deficiente em vitamina A em ratos adultos durante 3 meses promoveu um aumento na expressão de LN, FB e colágeno tipo IV na MEC do fígado (Aguilar *et al.*, 2008). Esteban-Pretel *et al.*, mais recentemente e também utilizando uma restrição de vitamina A, sendo a partir do desmame até os 60 dias de vida em ratos, mostraram um aumento na expressão de colágeno tipo IV, entretanto uma diminuição na expressão da LN e de MMPs (MMP-2 e MMP-9). E quando a restrição nutricional foi suspensa, os níveis de LN e MMP não foram revertidos (Esteban-Pretel *et al.*, 2013).

Em 2009, Penedo *et al.*, utilizaram uma dieta pobre em triptofano para alimentar ratas durante o período de amamentação dos filhotes, os quais no décimo dia de vida, sofreram um processo de lesão na retina. Os pesquisadores observaram, além de uma redução na plasticidade axonal após a lesão, uma diminuição da atividade da metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9), a qual é relacionada à ativação de fatores de crescimento (Penedo *et al.*, 2009).

1.3.2 DIETA BÁSICA REGIONAL

Na década de 1960, pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco realizaram um estudo na Zona da Mata Sul do estado para avaliar o estado nutricional das famílias dessa região, onde a desnutrição era na época ainda muito mais grave que nos dias atuais. Dessa pesquisa, eles identificaram os quatro alimentos mais consumidos por essa população e estabeleceram um modelo experimental de desnutrição severa a partir de uma dieta multideficiente denominada Dieta Básica Regional (DBR) (Medeiros *et al.*, 2008; Teodósio *et al.*, 1990). A DBR provoca no roedor um quadro similar à desnutrição crônica que ocorre principalmente no Norte e Nordeste do Brasil, caracterizado por perda muscular, de gordura subcutânea e dificuldade de crescimento e desenvolvimento físicos, e onde o indivíduo demonstra abatimento físico e sonolência, além de falta de disposição para realizar suas atividades (Teodósio *et al.*, 1990).

Abaixo, encontra-se uma comparação nutricional entre os componentes da DBR e os de uma dieta comercial, frequentemente utilizada, denominada labina ou Purina (Tabela 3). É possível perceber que a DBR não é desprovida apenas de proteínas, como a maioria dos modelos experimentais usados para o estudo da desnutrição. Mas a mesma também apresenta deficiência em outros constituintes não menos importantes que os proteicos, sendo esse o motivo da DBR ser conhecida como um modelo de desnutrição multifatorial severa.

Teodósio *et al.*, descreveram também que os conteúdos de fósforo (P), potássio (K), enxofre (S) e cálcio (Ca) são muito abaixo do que os requeridos numa dieta adequada para roedores. Do mesmo modo, os níveis de tiamina, ácido ascórbico, retinol, riboflavina, niacina, piridoxina, inositol, cianocobalamina e colina se apresentam extremamente baixos. A DBR é pobre em proteínas, não apenas em quantidade, mas também na qualidade, visto que 96% vem do feijão e da batata doce e 4% vem da carne de charque. Em relação aos aminoácidos, por exemplo, os precursores da síntese de neurotransmissores (tirosina) ou hormônios (fenilalanina) são apenas 17 e 28%, respectivamente. O alto conteúdo de carboidratos da DBR a torna isocalórica, dado que não há diferença significativa quando comparada à composição da dieta comercial (Teodósio *et al.*, 1990).

Dieta comercial labina		Dieta Básica Regional	
Constituintes	Quantidade (%)	Constituintes	Quantidade (%)
Proteínas	22,58	Proteínas	7,87
Gorduras	8,62	Gorduras	0,95
Carboidratos	50,44	Carboidratos	69,67
Fibras	2,00	Fibras	7,21
Sais Minerais	4,09	Sais Minerais	1,26

Tabela 3. Comparativo entre as composições da dieta comercial labina e a DBR Teodósio *et al.*, 1990.

Apesar das deficiências acima citadas, a composição de ácidos graxos essenciais na DBR chama particular atenção. Mesmo contendo apenas 1% de lipídios, a DBR é relativamente rica em ácidos graxos da família ômega-3, com níveis do ácido alfa-linolênico, cerca de 3 vezes maiores do que os presentes na dieta comercial labina, enquanto que os níveis do ácido linoléico da família ômega-6 são inferiores. A Tabela 4, publicada por Souza *et al.*, mostra o perfil de ácidos graxos das dietas labina e DBR (Souza, *et al.*, 2008).

A razão ômega-6:ômega-3 na dieta se reflete na composição desses lipídios no cérebro, visto que entre 50% a 60% do peso seco do cérebro adulto é formado lipídios, onde cerca de 35% são representados pelos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de cadeia longa, principalmente ácido

araquidônico (AA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (Madore *et al.*, 2014; Simopoulos, 2002; Wainwright, 2007).

	Dieta comercial labina (%)	DBR (%)
Somatório Ácidos Graxos Saturados	27,41±0,85	39,37±0,78**
Somatório Ácidos Graxos Monoinsaturados	22,52±1,28	25,96±0,78*
18:2n-6 cis-linoléico	45,48±1,15	19,66±0,85**
18:3n-6	0,13±0,01	0,23±0,02**
20:2n-6	2,87±0,20	Não determinado
20:4n-6 AA	0,31±0,03	0,44±0,04
22:4n-6	Não determinado	0,09±0,00
Somatório (n-6) PUFA	46,39±1,36	20,38±0,90**
18:3n-3 α -linolênico	2,87±0,09	11,44±0,57**
20:5n-3 EPA	0,16±0,01	0,48±0,05**
22:5n-3	0,21±0,02	0,16±0,01*
22:6n-3 DHA	0,31±0,03	0,20±0,02
Somatório (n-3) PUFA	3,44±0,07	12,25±0,57**
18:2n-6/18:3n-3	15,91±0,39	1,75±0,13**
18:2n-6 + 18:3n-3	48,35±0,94	31,10±0,62**
AA/DHA	1,00±0,03	2,20±0,03**
(n-6)/(n-3)	13,49±0,19	1,69±0,11**
(n-6) + (n-3)	49,82±1,43	32,63±1,09**

Tabela 4. Comparativo entre a composição de ácidos graxos da dieta comercial labina e da DBR.

* $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,001$. PUFA = Ácidos Graxos Poliinsaturados; EPA = Ácido Eicosapentenoico; AA = Ácido Araquidônico; DHA = Ácido Docosahexaenóico. (Souza, de *et al.*, 2008).

Durante o desenvolvimento do encéfalo, os PUFA são incorporados às membranas a partir de metade da gestação, aumentando no final da mesma e no período de aleitamento, quando a taxa de crescimento celular é máxima. Eles afetam a constituição das membranas celulares, os próprios receptores das membranas, canais iônicos, transdução de sinais, produção da bainha de mielina, dentre inúmeros processos celulares e moleculares do tecido nervoso (Tam and Innis, 2006). Uma maior disponibilidade de ômega-3 no cérebro favorece a fluidez das membranas, as respostas antioxidantes e anti-inflamatórias, além de contribuir para mecanismos envolvidos com a neurogênese, gliogênese e diferenciação das células neuronais (Das, 2006).

Souza, de *et al.*, avaliaram o perfil dos ácidos graxos no córtex frontal, cerebelo e hipocampo da prole cronicamente alimentada com a DBR até 70 dias de vida. Os autores observaram níveis similares de DHA no córtex cerebral de ambos os grupos e níveis mais elevados de DHA no hipocampo e cerebelo dos animais desnutridos. Os filhotes das mães desnutridas apresentaram déficits cognitivos nas tarefas que avaliam memória espacial, mas não naquelas que envolvem aprendizado diante de estímulos aversivos. Interessantemente, a reposição dietética a partir do aleitamento com a dieta comercial labina, reduziu os níveis de DHA encefálicos em relação aos que se mantiveram na dieta DBR (Souza, de *et al.*, 2008).

Dentre outros estudos com a DBR no sistema nervoso, em 2004, Mendonça *et al.*, estudaram os efeitos da desnutrição induzida pela DBR, desde a gestação ou aleitamento, na glia do hipotálamo, e detectaram um menor número de astrócitos tanto no núcleo supraquiasmático como na área pré-óptica medial (Mendonça *et al.*, 2004). Vilela *et al.*, observaram uma maior densidade de células ganglionares na retina de animais jovens desnutridos pela DBR desde a gestação, mas não detectaram mudanças nos neurônios imunorreativos ao neuropeptídeo Y, uma das substâncias responsáveis pela comunicação entre neurônios, no folheto intergeniculado do tálamo nem nos terminais destes neurônios no núcleo supraquiasmático (Vilela *et al.*, 2005).

Em 2005, Almeida *et al.*, analisaram os efeitos da DBR durante o período de aleitamento na mielinização do nervo óptico e detectaram que a mesma alterou a porcentagem de axônios mielinizados, bem como diminuiu significativamente a área de mielina no tecido analisado, demonstrando assim a vulnerabilidade dos oligodendrócitos a este tipo de desnutrição (Almeida *et al.*, 2005). Alterações na ontogenia de alguns reflexos relacionados ao nível de mielinização foram também descritas em animais desnutridos pela DBR durante o aleitamento (Barros *et al.*, 2006).

Enquanto alguns efeitos da DBR sobre a excitabilidade cortical parecem ser devidos, principalmente, à sua deficiência proteica, alguns efeitos desta dieta sobre a diferenciação e reatividade neuronais são surpreendentes. Borba *et al.*, observaram notável plasticidade fenotípica morfológica em neurônios do córtex cerebral da progênie de mães alimentadas com a DBR desde a gestação. Interessantemente, os autores observaram que esta dieta não comprometeu o desenvolvimento dendrítico neuronal no córtex cerebral. Além disto, viram também que após reposição nutricional a partir do 42º dia, os neurônios dos animais previamente desnutridos apresentaram uma considerável recuperação no tamanho de seus corpos celulares, tornando-se maiores que os do grupo controle (Borba *et al.*, 2000). Um dos principais fatores relacionados ao crescimento neurítico é a composição da MEC, onde evidências recentes têm indicado o papel protetor de ácidos graxos da família ômega-3 sobre a composição da mesma, através da redução dos níveis de MMPs, por exemplo (Shinto *et al.*, 2011; Sundrani *et al.*, 2011).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO ESTUDO

Dados recentes do nosso laboratório demonstram que a má-nutrição materna induzida pela DBR é capaz de alterar parâmetros morfo-funcionais de astrócitos corticais mantidos em cultura, os quais são sugestivos de um estado de reatividade e possível alteração na proliferação. Estudos sobre os efeitos da desnutrição na composição da MEC, utilizaram modelos de desnutrição apenas proteica ou de determinados nutrientes isolados, contudo, a composição multideficiente da DBR, complementada por seu alto teor em ômega-3, sugere um modelo de desnutrição no qual o papel deste lipídio se torna um diferencial extremamente relevante, dada a sua importância para o desenvolvimento do tecido nervoso, mesmo em um contexto de deficiência multifatorial.

Como também visto acima, a FB se relaciona fundamentalmente com processos celulares essenciais para a maturação do tecido como a proliferação e a diferenciação, bem como com o crescimento neurítico e dendrítico. Ao nosso conhecimento apenas um estudo prévio analisou a influência da má-nutrição sobre a expressão de glicoproteínas da MEC no sistema nervoso central e observou um aumento nos glicosaminoglicanos, apesar de uma diminuição nos níveis dos carboidratos componentes das glicoproteínas em homogenados do encéfalo total de animais jovens após o desmame (Manojkumar and Kurup, 1998). No entanto, nada se sabe sobre os efeitos da má-nutrição sobre a formação das redes perineuronais, essenciais para os mecanismos de plasticidade e neuroproteção no sistema nervoso central.

Dessa forma, o presente estudo visou testar a hipótese de que esta deficiência multifatorial durante a gestação diminuiria a expressão da FB e das PNNs produzidas pelas células neuronais e astrocitárias do córtex cerebral dos ratos neonatos, modificando em contrapartida a proliferação e diferenciação dos próprios neurônios e astrócitos, em culturas astrocitárias e mistas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a expressão de componentes da matriz extracelular e a distribuição das redes perineuronais em culturas astrocitárias e mistas do córtex cerebral de ratos neonatos cujas mães foram desnutridas pela DBR desde 30 dias antes do período gestacional até o terceiro dia de amamentação.

3.2. Específicos

- Avaliar a proliferação celular astrocitária através da imunomarcação com KI67;
- Avaliar a complexidade dendrítica de neurônios co-cultivados sobre astrócitos de proles provenientes de mães com diferentes condições nutricionais;
- Avaliar a concentração e a expressão da fibronectina em culturas astrocitárias através de Western blotting;
- Avaliar o arranjo das redes perineuronais em culturas mistas através de imunocitoquímica das lectinas *Wisteria floribunda* e da *Vicia villosa*, bem como do proteoglicano sulfato de condroitina-4.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar. Os animais foram criados no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, com livre acesso à dieta e à água e ciclo de 12 horas de claro e escuro. Fêmeas nulíparas foram divididas em dois grupos: (1) Controle, alimentado com ração labina; e o (2) Desnutrido, alimentado com DBR, desde 30 dias antes do acasalamento, durante o acasalamento e toda a gestação. Para cada experimento foram obtidas 3 culturas diferentes originadas de pools de pelo menos 3 filhotes por dieta. Todas as etapas experimentais foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE sob o Processo de número: 23076.056375/2012-98 (Apêndice 2).

4.2. DIETA BÁSICA REGIONAL

A composição de ingredientes e nutrientes da DBR está demonstrada na tabela abaixo (Tabela 5):

Constituintes	Quant. (g)	Proteínas (%)	Carboidrato (%)	Gordura (%)	Sais (%)	Fibra (%)
Feijão Carioca	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09
Farinha de Mandioca	64,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64
Charque desengordurada	3,74	2,74	0,43	0,06	0,06	-
Gordura da Charque	0,35	-	-	0,35	-	-
Batata Doce	12,76	0,3	9,99	0,03	0,2	0,48
Total	100	7,87	69,67	0,95	1,26	7,21

Tabela 5. Composição da DBR. Teodósio *et al.*, 1990.

4.3. CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS

Foram realizadas culturas dos animais recém-nascidos dos dois grupos, até o terceiro dia de nascimento dos mesmos (Pn0 - Pn3; Sendo Pn0 o dia de nascimento dos neonatos). Os animais foram decapitados, a pele e a estrutura pré-óssea retiradas para isolamento do córtex cerebral. A meninge foi removida e as estruturas foram mantidas em PBS-glicose (tampão salina fosfato com glicose 0,6%). Após a dissecação, o tecido foi dissociado, primeiramente em placas de petri e, em seguida, em tubos de 15ml. Após a centrifugação das células livres em suspensão, a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foram adicionados 3 ml de DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium com nutriente F-12, Gibco) suplementado com glicose (33mM), glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (3mM), Penicilina/Streptomicina (0,5 mg/ml) e Fungizona (2,5 µg/ml) e Soro Fetal Bovino (Gibco) a 10%.

Para cada cérebro dissecado foram produzidas 2 garrafas 25cm² para proliferação ao longo de 10 dias, mantidas a 37°C, 85% de umidade e 5% de CO₂, com troca de meio e soro a cada 2 dias. As passagens foram feitas a cada 10 dias ou quando as células atingiam a confluência, a partir do sétimo dia. O tempo total de manutenção das culturas foi de 40 dias, com o intuito de que as células atingissem maturidade e ficassem tempo suficiente em meio e condições adequadas para possivelmente reverter o quadro de desnutrição o qual se encontrava no animal de origem.

4.4. CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS

Para obtenção das culturas mistas, os procedimentos de dissecação dos cérebros dos neonatos até a distribuição das células ocorreram da mesma maneira que para a obtenção das culturas primárias astrocitárias. Contudo, as células foram mantidas em placas de 6 poços, na proporção de um cérebro para cada 3 poços, a 37°C, 85% de umidade e 5% de CO₂.

Após as primeiras 48h de cultura, portanto, na primeira troca de meio e soro, os mesmos foram substituídos por uma mistura contendo 50% de meio DMEM-F12 com Soro Fetal Bovino a 10%, mais 50% de meio Neurobasal (Gibco – Life Technologies) com Soro B27 (Gibco) a 1%. Essa mistura era então composta por fatores de crescimento e nutrientes necessários a ambos os tipos celulares, os neurônios e os astrócitos. A troca de meio era feita com substituição de apenas 50% do meio antigo por meio novo, dado que sem essa condição os neurônios tendem a morrer em poucos dias de cultivo. As culturas foram mantidas por 10 dias, sem passagens.

4.5. CO-CULTURAS DE NEURÔNIOS SOBRE ASTRÓCITOS

Quando as células gliais atingiram cerca de 70% de confluência, foram lavadas 3 vezes com meio DMEM-F12 sem soro, e sobre elas foram plaqueados neurônios de córtex de embriões entre 14 a 17 dias de gestação, frescamente preparados, na densidade de 5×10^4 células/poço. As co-culturas foram mantidas em meio DMEM-F12 sem soro, a 37°C e 5% de CO₂ por 24 a 48 horas, quando foram fixadas para os procedimentos de imunocitoquímica.

4.6. IMUNOCITOQUÍMICA

As células confluentes foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 20 minutos. Após três lavagens com Tampão Fosfato 0,1M (TF) foram bloqueadas por 30 minutos com uma solução contendo 3% de albumina e 1% de Triton em TF. Após o bloqueio, as células foram incubadas com os anticorpos específicos primários diluídos em solução bloqueio, durante toda a noite, à temperatura ambiente.

As células foram então lavadas três vezes com TF e incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes por 3 horas ou biotinilados por 1h30, à temperatura ambiente. Seguiu-se então à incubação com Streptavidina (Sigma, 1:500) por 1 hora e revelação colorimétrica por Diaminobenzidina (DAB) (Sigma) para as marcações não-fluorescentes. Para as marcações fluorescentes foram obtidas imagens digitalizadas em um microscópio de epifluorescência da Leica. As imagens foram analisadas no programa de imagens Adobe Photoshop CS, versão 8.0.

Os anticorpos primários utilizados foram monoclonal anti- β -tubulina-3 produzido em camundongo (Santa Cruz, 1:500) para visualização de neurônios, policlonal feito em coelho anti-GFAP (Invitrogen, 1:200) e policlonal feito em camundongo anti-Vimentina (Byosistem, 1:200) para visualização de astrócitos maduros e imaturos, respectivamente. As aglutininas *Wisteria floribunda* (Vector, 1:500) e *Vicia villosa* (Sigma, 1:500), ambas biotiniladas, e o monoclonal feito em camundongo anti-sulfato de condroitina-4 (Chemicon, 1:500), foram utilizados para visualização das redes perineuronais e o policlonal feito em camundongo anti-KI67 (Novo Castra, 1:200) para visualização da proliferação celular.

Os anticorpos secundários biotinilados utilizados foram o anti-coelho feito em cabra (Jackson, 1:1000) e o anti-camundongo feito em cabra (Jackson, 1:1000), bem como os

fluorescentes foram o anti-coelho (Dylight 488, Rockland, 1:5000) e anti-camundongo (Dylight 594, Rockland, 1:5000).

4.7. WESTERN BLOTTING

Para a coleta das amostras para o Western Blotting, as culturas foram lavadas com Tampão Salina-Fosfato (PBS) gelado e em seguida, homogeneizadas sobre gelo e lisadas em 1mL de Tampão de Lise contendo EGTA 0,5mM, Tris-HCl 20mM, EDTA 0,5mM e 2- β -Mercaptoetanol 0,01%. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método do Ácido Bicinonínico (Kit BCA – Gibco), utilizando a albumina como padrão. As proteínas foram então diluídas na concentração desejada no Tampão de Amostra, composto por 0,5mL de Tris-HCl 10M, 8ml de Glicerol, 1,6g de SDS, 4ml de β -mercaptoetanol e 0,02g de azul de bromofenol, totalizando um volume estoque de 16mL. Antes de serem utilizadas na corrida, as amostras foram aquecidas por 5 minutos a 90°C.

As proteínas extraídas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%, sendo sempre colocadas numa concentração de 50 μ g/poço para expressão da fibronectina e 30 μ g/poço para expressão do GFAP, Vimentina e PCNA. A composição dos géis encontra-se detalhada na Tabela 6. O marcador de peso molecular utilizado para acompanhamento da corrida das bandas protéicas foi o Precision Plus Kaleidoscope Protein Standards (Bio-Rad). A corrida foi feita a 60mA por gel e durava entre 1h-1h30, em Tampão de Corrida pH 8,3 contendo Tris-Base 25mM, Glicina 250mM e SDS 0,1%. A transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare) ocorreu a 200mA por 2 horas em Tampão de Transferência pH 9,2 contendo Tris-Base 48mM, Glicina 39mM, SDS 1.3mM (0,375%) e Metanol 20%, após o equilíbrio da membrana em água milliq por 20 segundos e no Tampão de Transferência por 5 minutos.

Para a revelação do western blotting, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada por 1 hora em TBS composto por Tris-HCl (0,24%) e NaCl (0,8%), em água destilada e pH 7,6, além de Tween 20 a 1% (TBS-T) e leite desnatado a 5%. Os anticorpos primários, especificados na tabela 7, foram diluídos em solução idêntica à solução bloqueio e as membranas foram incubadas durante toda a noite a 4°C.

Reagentes	Lower gel	Upper gel
Água Destilada	2,2 ml	1,4 ml
Tris-HCl pH 8,8	1,875 ml	-
Tris-HCl pH 6,8	-	330 µl
Mix Acrilamida 30% / Bisacrilamida	3,35 ml	250 µl
SDS 10%	75 µl	20 µl
Persulfato de Amônia	125 µl	20 µl
TEMED	12,5 µl	2 µl

Tabela 6. Composição dos géis SDS-PAGE.

No dia seguinte, iniciavam-se as 3 lavagens por 10 minutos com TBS-T e em seguida a incubação com os anticorpos secundários biotinilados anti-coelho ou anti-camundongo, ambos feitos em cabra, diluídos em TBS-T e cujas especificações também se encontram na Tabela 7. As membranas eram novamente lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T, incubadas por 1 hora com Streptavidina (1:500 em TBST) e reveladas por DAB para visualização colorimétrica das bandas. A normalização dos dados foi feita em relação à expressão da β -Actina, usada como padrão interno. A concentração de proteína obtida pela análise das curvas densitométricas foi calculada pelo Programa Image J com intervalo de confiança de 95%, bem como as áreas sob as curvas.

Anticorpos			Diluição	Empresa/Marca
Anti- β -Actina	Camundongo	Primário	1:2500	Sigma
Anti-Fibronectina	Coelho	Primário	1:1000	Sigma
Anti-GFAP	Coelho	Primário	1:4000	DAKO
Anti-Vimentina	Camundongo	Primário	1:500	Biosystem
Anti-Camundongo biotinilado	Cabra	Secundário	1:1000	Jackson
Anti-Coelho biotinilado	Cabra	Secundário	1:1000	Jackson

Tabela 7. Anticorpos utilizados no Western Blotting.

5. RESULTADOS

5.1 Má-nutrição materna induziu respostas adaptativas nas interações neurônio-astrocito favorecendo o crescimento neurítico

Introduction

It is well established that maternal malnutrition during pregnancy can modify the progeny's brain competence to maintain homeostasis under stressful conditions (Antonow-Schlorke *et al.*, 2011; Levitsky and Barbara J. Strupp, 1995; Spencer and Palmer, 2012). Although some deleterious effects can be reduced by nutritional reposition starting from lactation period, others can persist until adult life as a consequence of epigenetic modifications (Jiménez-Chillarón *et al.*, 2012; Morgane *et al.*, 1993; Richetto and Riva, 2014). Neurons and oligodendrocytes are especially vulnerable to different types of fetal and neonatal malnutrition while astrocytes are more resilient to lesions under those conditions (Ranade *et al.*, 2012).

Early and recent evidence *in vivo* has indicated that astrocyte phenotypic changes, delayed or precocious astrogliogenesis, can occur at birth in different brain regions as a result of low protein levels in the maternal diet (Gressens *et al.*, 1997). Feoli *et al.* using a maternal diet containing only 7% protein (casein), during gestation and lactation periods, reported that increased levels of enzymatic and other molecular markers indicates a transient astrogliosis in the cerebral cortex but not in the hippocampus or cerebellum of malnourished pups at postnatal day 2 (Feoli *et al.*, 2008). Lower levels of glutathione and glutathione peroxidase were also found in the cerebral cortex and hippocampus of similar group of neonates, associated to lower total antioxidant reactivity (Feoli *et al.*, 2006). However, several of these biochemical changes in astrocytes were completely recovered during brain maturation, even keeping the animals in the same protein restricted diet through adulthood (Feoli *et al.*, 2006, 2008).

Astrocytes, are implicated in the metabolic support of neurons, releasing neurotrophic factors, antioxidant molecules and components of extracellular matrix (Freeman, 2010; Kettenmann and Verkhratsky, 2008; Takuma, Baba and Matsuda, 2004). Early modifications in their metabolism or in their ability to react under condition of malnutrition may impair neuronal growth or survival as well as synapse function during brain development (Allen, 2013; Jensen, Massie and Keyser, De,

2013). Recent evidence has indicated that maternal food restriction during pregnancy and lactation results in enhanced levels of glucose transport 1, glycogen and in the phosphorylated isoform of glycogen synthase kinase-3, mainly expressed in astrocytes, in the cerebral cortex of 10 days-old pups (Lizárraga-Mollinedo *et al.*, 2010).

In vivo studies have indicated that pre and/or postnatal malnutrition induced by a diet containing 6% casein are able to promote permanent anomalies in the neuronal morphology in the cerebral cortex and other brain regions (Durán *et al.*, 2008; Morgane, Mokler and Galler, 2002; Morgane *et al.*, 1993). Parameters such as dendrite number and their complexity were not recovered after nutritional rehabilitation with adequate levels of protein (23% casein) even when glial cell density and synapse/neuron ratio is apparently restored (Cintra *et al.*, 1990).

On the other hand, using a maternal diet called Regional Basic Diet (RBD) that containing 8% protein mainly from vegetable sources and 1% of lipids, Borba *et al.*, reported morphological phenotypic plasticity in cerebral cortex neurons of the progeny (Borba *et al.*, 2000). Interestingly, they observed that this type of diet reduced the soma size but did not impair neuronal dendritic development in the young progeny. Moreover, when a balanced diet was given to the animals from 42th postnatal day, the neuronal soma area increased at a greater extent than those of well-nourished group.

A peculiar feature present in the RBD diet is that despite its low quantity in lipids, it is relatively rich in n-3 α -linolenic fatty acid (12%) and contains reduced amount of n-6 linoleic fatty acid (~19.7%) which results in n-6/n-3 fatty acid ratio of 1.69 (Souza, de *et al.*, 2008). This ratio is lower than in casein-based diets mainly used as control, containing ~55% linoleic and 6% α -linolenic fatty acid (n-6/n-3 ratio = 9.3). These essential fatty acids are precursors of the polyunsaturated long chain fatty acids (LC-PUFAs) docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA), which usually play key roles during brain development (Chang, Ke and Chen, 2009; Coti Bertrand, O'Kusky and Innis, 2006; Guesnet and Alessandri, 2011; Haggarty, 2010). DHA has been implicated in the neural stem cell proliferation, astrocyte and neuron differentiation and exerts neuroprotective actions (Calderon and Kim, 2004). AA is mainly involved in neuronal cell signaling and plasticity but in high levels can reduce DHA synthesis and induce an inflammatory condition (Ecker *et al.*, 2009). Thus, a reduced n6/n3 ratio in the maternal diet is recommended during progeny's brain development favoring beneficial effects of DHA including those that involve neuritic growth and epigenetic modifications (Coti Bertrand, O'Kusky and Innis, 2006; Simopoulos, 2002).

The present study investigated how a maternal dietary treatment with RDB could affect the proliferation and differentiation of astrocytes of neonate's cerebral cortex as well as the ability of these cells to act on neuronal growth *in vitro*. We have tested the hypothesis that a low n6/n3 essential fatty acids ratio in this maternal diet could minimize deleterious effects induced by its low protein and lipid levels on neuronal differentiation, favoring neurite outgrowth during neuron-astrocyte interaction. In order to investigate how each one of these cells could be affected by this type of malnutrition the neurite outgrowth and dendritic complexity were analyzed when neurons and astrocytes of neonates were provided from mothers with distinct nutritional condition.

Materials and Methods

Animals and diets

Sixty progenitor adult Wistar rats (40 females and 20 males) were used in this study. These animals were divided randomly into two groups according to the nutritional condition. Control rats were fed with a commercial balanced diet, comprising 22% protein content while malnourished rats were fed with RBD diet (Teodósio *et al.*, 1990). The composition of the experimental diets, both containing around 380 kcal/100g is shown in Table 1. The mothers started receiving the respective diets 30 days before mating and were maintained on those diets during gestation and first week of lactation. The offspring constituted the object of the present study. At parturition, litter size, total litter weight and mean birth weight of the pups were recorded. In the postnatal days, between the first and the third one, pups from different litters (2-3 per litter/group) were grouped to obtain cerebral cortex primary cultures, as described below. All procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research of Federal University of Pernambuco (protocol #009428/200633), which complies with the "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH, Bethesda, USA).

Astrocyte primary cultures

Primary cultures of astrocytes were prepared as described by Moura-Neto *et al.*, 1983 (Moura Neto *et al.*, 1983). Pups from different litters per group were decapitated and the cerebral cortex was dissected in phosphate buffer containing 0,6% glucose (PBS-glucose), followed by

mechanic dissociation. Cell suspension was diluted in PBS-glucose plus Dulbecco's modified Eagle's medium and nutrient mixture F-12 (DMEM-F-12, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 33mM glucose (Merck), 2mM glutamine (Calbiochem), 3mM sodium bicarbonate (Merck), 0,5mg/ml penicilin/streptomycin (Invitrogen), 2,5µg/ml amphotericin (Sigma) and then centrifuged for 5 minutes (1,500 rpm). Cells were plated in plastic bottles (25cm²) and incubated in DMEM-F-12 medium, at 37°C in a humidified 5% CO₂ 95% air atmosphere. The medium was replaced every 2-3 days. After 10 days in vitro (div) it was carried out the first passage of cells (P1), using trypsin (0.25% + EDTA %; Sigma) for 5 minutes. Cells were kept on P1 for 10 div and two subsequent passages (P2 and P3) were done in order to investigate whether some features of astrocytes provided from malnourished pups could be reversed by the culture medium.

Commercial Balanced Diet		Regional Basic Diet (RBD)	
Nutrients	Quantity (%)	Nutrients	Quantity (%)
Proteins	22,58	Proteins	7,87
Lipids	8,62	Lipids	0,95
Carbohydrates	50,44	Carbohydrates	69,67
Fibers	2,00	Fibers	7,21
Minerals	4,09	Minerals	1,26

Table 1. Composition of diets.

Immunocytochemistry for astrocyte cultures

To analyze the expression profile of intermediate filaments and proliferation markers in astrocyte cultures was assessed. For immunocytochemistry, cell cultures were placed on coverslips coated with 1µg/ml poly-l-lysine (Sigma), in 24-well plates (2x10⁵ cels/well). Three days after each passage (3dP1; 3dP2; and 3dP3), these cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes and washed in PBS 0,1M. To visualize the intermediate filaments, Vimentin and GFAP, immunofluorescence approach was adopted. Briefly, cells were firstly blocked with 3% BSA (Sigma Chemical Co.) and 1% Triton X-100 (Riedel de Haen-Germany) in PBS for 30 minutes and then incubated in the presence of rabbit anti-GFAP (Diag. Biosystems 1:200) and mouse anti-

vimentin antibodies (Diag. Biosystems 1:200), overnight at 4°C. After primary antibodies incubation, cells were rinsed with PBS and incubated simultaneously with the secondary antibodies anti-rabbit (Dylight 488, Rockland - 1:5000) and anti-mouse (Dylight 594, Rockland – 1:5000) for 3 hours at room temperature. After that, the cells were rinsed again in PBS and incubated with Hoechst 33342 (nuclear fluorescent marker – 1:1000) for 5 minutes. The cultures were mounted on 40% glycerol diluted in PBS and examined under an epifluorescent Leica microscope.

To investigate the effect of maternal malnutrition on astrocyte proliferation in the cerebral cortex of neonates, double labeling for GFAP and the protein Ki67 was carried out in cells cultured for 3 div after the first passage (only in 3dP1). In these experiments, cell cultures were first immunolabeled using a polyclonal mouse-anti Ki-67 (Novocastra, 1:200; overnight at 4°C) which was visualized using a biotinylated goat anti-mouse secondary antibody (Jackson, 1:1000) for 1 hour, followed by streptavidin (Sigma, 1:250) for more 1 hour and the cromogen diaminobenzidine (2.5 µg/ml + H₂O₂ 0.03% in PBS 0.1M, for 10 minutes). Subsequently, cell cultures were rinsed in PBS and incubated in glycine buffer (0.02 M, pH 2.2) for 20 min. Then, they were washed in PBS and immunostained with rabbit anti-GFAP (Invitrogen; 1:200) and mouse-anti-vimentin (Biosystem; 1:200) for 18 h, at 4°C), which were visualized with the secondary antibodies goat anti-rabbit (Dylight 488, Rockland – 1:5000) and goat-anti-mouse (Dylight 594, Rockland – 1:5000) for 3h at room temperature.

Western blotting assay for astrocyte cultures

Homogenates of astrocyte cultures 3 div after the first passage (only in 3dP1) were obtained in freshly prepared 20 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl₂, 0,6 mM CaCl₂, 0.5 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.05% Triton x-100. An aliquot of each culture was taken to determine protein content by the BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific). Samples of homogenates were diluted in sample buffer (62.5 mM tris/HCl, pH 7.4, containing 4% SDS, 10% glycerol, 10% β-mercaptoethanol and 0.002% bromophenol blue) and boiled for approximately 5 minutes. 30 micrograms of protein per lane were electrophoretically separated in 10% gradient sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel at 120mA. After separation, the proteins were transferred to Hybond-nitrocelullose transfer membrane (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) for 2 hours at 200mA. Membranes were blocked for 1 hour in Tris-buffered saline-Tween 20 (TBS-T) containing 5% of fat-free milk. Then,

incubated in primary antibodies rabbit anti-GFAP (Dako; 1:4000) diluted in block solution overnight at 4°C. After several washes in TBS-T, the biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit Jackson 1:1000) diluted in TBS-T was added to the membrane and incubated for 2 hours, followed by streptavidin-HRP (Sigma, 1:500) for 1 hour. Proteins were visualized using the chromogen diaminobenzidine (Sigma, 2.5 µg/ml + H₂O₂ 0.03% in PBS 0.1M). Digital images of the blots were obtained and the integrated optical density was estimated by using Image J 1.46 software (NIH, USA). The protein levels were normalized to that of the β-actin (Sigma, 1:2500) protein that was used as an internal standard.

Morphometry and quantification of expression profile of intermediate filaments in astrocyte monolayers and number of proliferating astrocytes

The analysis of proliferating astrocytes was achieved in three independent cultures/group. Three coverslips per culture were analyzed and digital images of 80 fields per culture were obtained using a DFC 345 FX camera coupled to a Leica, DM 5500-B automated upright microscope and 40x planachromatic objective. Bright field and fluorescent images were done for Ki-67 and GFAP/vimentin labeling respectively, at the same field. The mitotic index was measured by counting the percentage of positive ki-67 cells compared to the total number of astrocytes in the coverslips.

Co-cultures of neurons and astrocytes with similar or distinct nutritional condition

To investigate how intrinsic properties of cortical neurons or astrocytes of neonates delivered from malnourished mothers could affect neurite outgrowth, co-cultures of neurons onto astrocytes were carried out in four different combinations: 1) control neurons over control astrocytes; 2) malnourished neurons over control astrocytes; 3) control neurons over malnourished astrocytes and; 4) malnourished neurons over malnourished astrocytes. Firstly, primary cultures of astrocytes were prepared as described above and maintained until confluence. For the co-cultures of neurons on these astrocyte cultures, pregnant females in the 16th gestational day (E16) were anesthetized with isofluorane and then decapitated. The pre-anesthesia with volatile agents to prevent pain and reflexes was adopted as a recognized procedure by animal welfare regulatory agencies (e.g. CONCEA, Brazil; UK Animals Scientific Procedure, 1986). Neurons from the E16

embryos were freshly dissociated from the cerebral cortex in serum free DMEM-F12 medium. The confluent astrocyte monolayers, that were in 24 well plates were washed three times with serum free DMEM-F12 and subsequently, the E16 neurons freshly dissociated were plated over the astrocytes in a density of 50,000 cells/well. The co-cultures were kept at 37°C in a humidified 5%, CO₂ 95% air atmosphere for 48 h and then fixed in paraformaldehyde 4% for 20 minutes.

Immunocytochemistry for co-cultures

Double immunostaining for neuronal and astrocyte markers was carried out in the co-cultures. In these experiments, cells were firstly incubated with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS + triton X-100 0.3% for 1 hour and then in a mixture of rabbit anti-GFAP (Invitrogen, 1:400) and mouse anti- β tubulin III (Sigma, 1:400) in PBS + triton X-100 0.3% for 18 hours at 4°C. Neurons and astrocytes were respectively visualized with the secondary antibodies goat anti-mouse (Dylight 594, Rockland) and goat anti-rabbit (Dylight 488, Rockland) both diluted 1:5000 and incubated for 3 hours at room temperature. After that, the cells were rinsed in PBS and labeled with Hoechst 33342 (nuclear fluorescent marker – 1:5000) for 5 minutes. The cultures were mounted on 40% glycerol diluted in PBS and examined under an epifluorescent Leica microscope (Model DM 5500-B) coupled to a DFC 345 FX camera. Digital images of several fields per coverslips were taken to neuronal morphometric analysis, as described below.

Analysis of neuronal morphometry in the co-cultures

Parameters of neurite outgrowth in neurons cultured onto astrocyte monolayers were measured using the Neuron J plug-in of Image J 1.48 software according to Meijering *et al.*, (2004). Three coverslips per culture were analyzed and at least 25 fields were measured per coverslip. All neurites emerged from neuronal soma were considered. The number of neurites emerging from the soma, the sum of all neurite measurements per neuron and the sum of all neurite measurements divided by the number of process per neuron was analyzed. Fractal dimension and branching area were assessed using Frac-Lab plug-in of Image J version 1.48 software according to protocol described by Barreto *et al.*, (2014).

Statistical analysis

Statistical analyses were done using the following tests: Z-test for comparison between proportion of cells with distinct expression profile of intermediate filaments; Mann-Whitney for comparison of astrocyte soma size; Two-way ANOVA coupled to Tukey's Honestly-Significant Difference for comparison of multiple variables. All statistical analyses were performed using non-transformed data, except data of neuron axonal length obtained in co-cultures. In this case, data were transformed using the $\log(x+1)$ followed by two-way ANOVA, investigating the effects of neuron, astrocytes and the interaction between these factors in defining the axonal length in the co-cultures. It was used the SYSTAT 13, GraphPad Prism 4.0, and Origin Pro 8.0 softwares. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The experiments were performed in triplicate, and each result represents the mean of independent experiments.

Results

Maternal RBD malnutrition induces long-lasting modifications on the intermediate filament expression in cortical astrocytes.

The quantitative analysis of number of cells expressing vimentin or GFAP only (Fig. 1A) or co-expressing both intermediate filaments (Fig. 1B) demonstrated that astrocyte cultures from malnourished newborns contain lower number of cells expressing vimentin⁺ (Control: 3dP1=23.6%, 3dP2=49.4%, 3dP3=24.3% vs Malnourished P1=12.8%, P2=29.3%, P3=7%) only as compared to control condition. These findings were seen despite the time of cell growth *in vitro*, being present in the early stages of cell growth 3dP1 (13 div) as well as 3dP3 (33 div). On the other hand, a greater proportion of cells co-expressing vimentin + GFAP (Control: 3dP1=13.4% and 3dP3=4.8% vs Malnourished: 3dP1=32.3% and 3dP3=15.1%), or expressing GFAP⁺ only, (Control: 3dP1=63%, 3dP2=27.6%, 3dP3=70.9% vs Malnourished: 3dP1=54.9%, 3dP2=47.75%, 3dP3=75.6%) were found in astrocyte cultures of malnourished animals when compared to that found in the control condition.

In order to evaluate if these effects could reflect modifications on protein levels of these intermediate filaments, western blotting experiments were carried out in homogenates of astrocyte cultures 3dP1. As shown in the Figure 2, RBD maternal malnutrition did not influence intergroups differences for GFAP protein content.

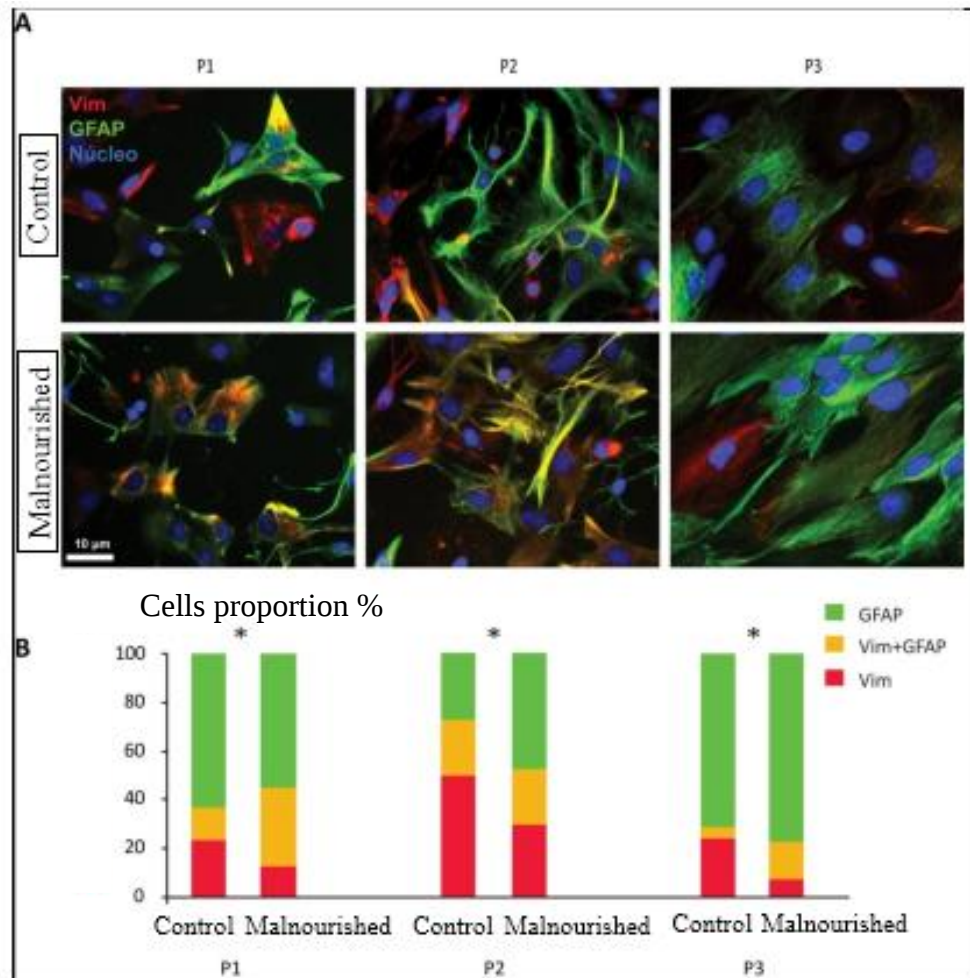


Figure 1. Effects of maternal malnutrition on regulation of intermediate filaments expression in primary cortical astrocytes cultures. (A) Representative photomicrographs of vimentin (red) and GFAP (green) expressions in astrocytes, over time. (B) Graphic shows proportion of three astrocyte populations in control and malnourished cultures, according vimentin expression (red bar), vimentin and GFAP co-expression (yellow bar) and GFAP expression (green bar), over time. Note similar patterns on regulation of intermediate filaments expression over time on control and malnourished groups. Total number of cells counted P1=4446, P2=1691, P3=1105 and P1=3299, P2=1775, P3=1599 for control and malnourished, respectively. Data were obtained from 2 cultures of each period of time. * $p < 0.05$, Z test for difference between the proportions of both groups, for each period of time analyzed.

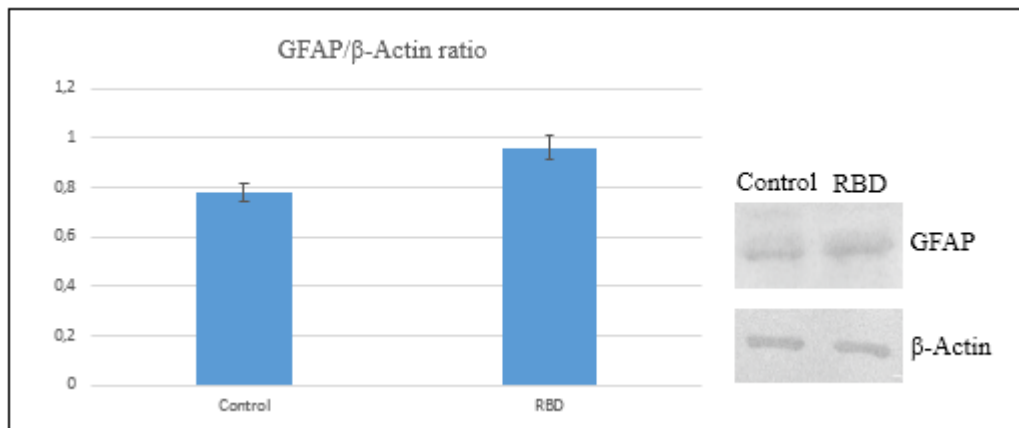
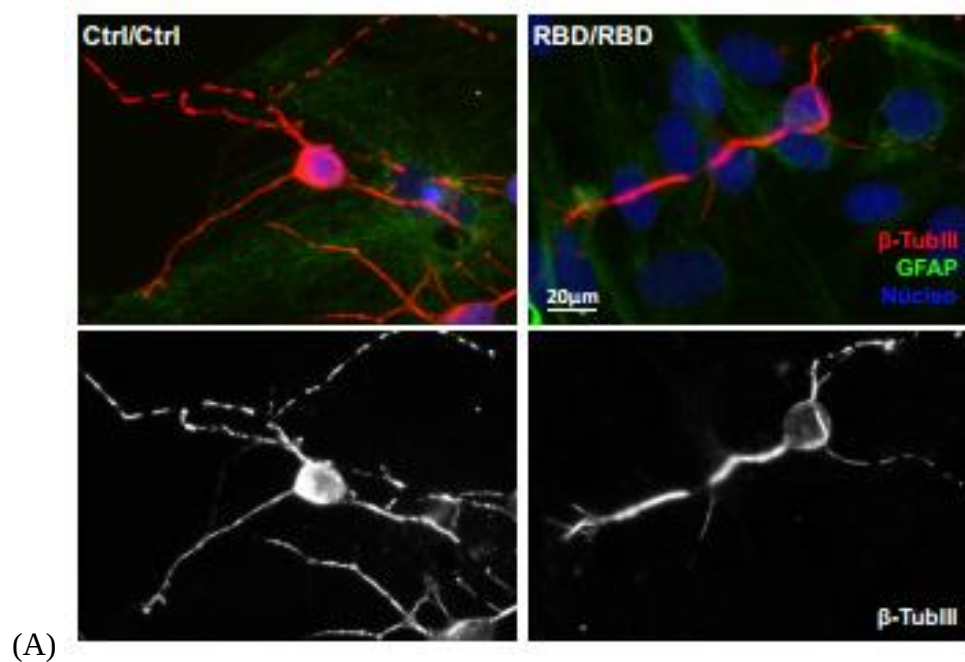


Figure 2. Western blotting to GFAP. Samples (30µg/lane) were separated by SDS-PAGE under reducing conditions followed by electrotransfer onto nitrocellulose membranes for immunodetection of GFAP in 13div (3dP1). No differences between the groups were revealed.

Maternal malnutrition does not affect neurite outgrowth

Multiple comparisons between all the interactions demonstrated that axonal outgrowth was lower in co-cultures from distinct nutritional conditions, when compared to control co-culture. However, the axonal length is similar in co-cultures which cells are derived from the same nutritional context, suggesting that metabolic adaptations could be contributing to a better intercellular communication (Figure 3).



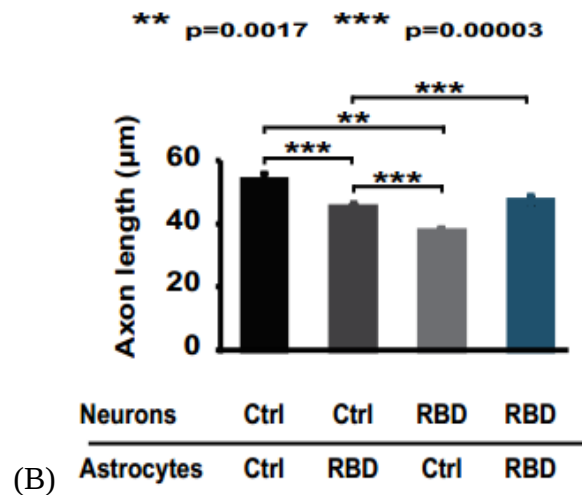


Figure 3. Analysis of axonal length in co-cultures of cortical neurons and astrocytes. (A) Illustrative photomicrographs of primary co-cultures of control and neurons astrocytes (a and a', Control/Control) as well as malnourished neurons and astrocytes (b and b', Malnour/Malnour). (a and b) show overlap from the different channels of immunostaining for neurons (β -tubulin III, red), astrocytes (GFAP, green) and nucleus cells (Hoechst, blue). Photomicrographs in gray scale (a' and b') show only β -tubulin III immunostaining used for axonal length measurement. (B) Box graphic show axonal length in co-cultures from different nutritional condition of neurons and astrocytes (Total number of cells analyzed: control neurons/control astrocytes = 327; malnourished neurons/control astrocytes = 438; control neurons/malnourished astrocytes = 373; and malnourished neurons/malnourished astrocytes = 362). Data were obtained from two distinct co-cultures.

Maternal malnutrition increase proliferating index of astrocytes in the early stages of cortical development

Figure 4 shows high magnification images of cortical astrocyte cultures from control and malnourished neonates double-labelled for the nuclear protein KI-67 and dapi. Quantification of proliferation index in three independent cultures/group revealed that the number of KI-67+ astrocytes was significantly greater in cerebral cortex of malnourished than in the control group of neonates in 3dP1.

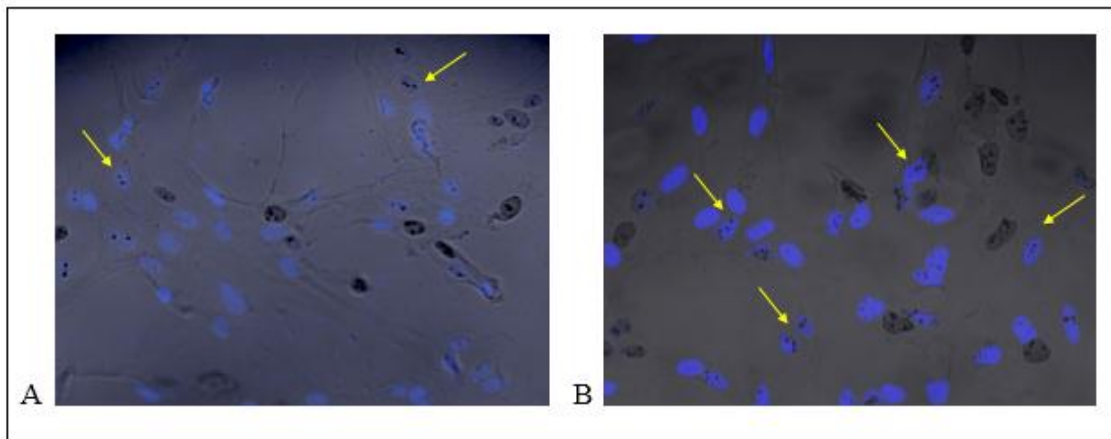


Figure 4. Analysis of astrocyte proliferation in control and malnourished conditions in 3dP1. In blue (DAPI), the nucleus of astrocyte and in the double labeling with DAPI and DAB showing the nucleus in proliferation, marked by KI67. The malnourished group demonstrated a number of KI67+ astrocytes (4B) higher than the control group (4A).

Conclusion

The data showed that a severe maternal malnutrition induced by a multinutrient deficiency modifies the ability of astrocytes produce and disposal their own cytoskeleton as well an important cellular behaviour, the proliferation.

Despite the altered morphology presented by the malnourished astrocytes, in the co-cultures, the malnourished astrocytes and neurons did not show an altered morphology through the neuritic outgrowth. On the contrary, these neurons from malnourished pupils developed as well the cells from the control group.

Altogether, the results obtained suggest adaptive reactions related to different nutritional *status*. It is not clear at this moment whether these changes are a consequence of a delayed stage of brain development. Future studies will be done in order to address this question, especially taken into account that malnutrition early in life can induce permanent effects on the brain plasticity and maturation.

5.2

Má-nutrição modificou a composição da matriz extracelular e impediu a formação das redes perineuronais no córtex cerebral de ratos neonatos

Introduction

The extracellular matrix (ECM) of the central nervous system is a loose scaffold compound of glycoproteins, such as laminin, fibronectin (FN) and tenascin, as well as proteoglycans and chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) interlaced in a meshwork. Neuron and glial cells surrounded by the ECM are the responsible for producing and secreting components of this specific net (Celio *et al.*, 1998; Wiese, Karus and Faissner, 2012). During brain development several changes occur in the composition of ECM in order to support processes such as neurogenesis, gliogenesis, synaptogenesis, migration, adhesion and cellular proliferation, besides axonal guiding and outgrowth (Faissner *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2009; McRae and Porter, 2012; Morgane, Mokler and Galler, 2002; Plantman, 2013).

In adulthood, the ECM plays important functions related to cell survival and regenerative plasticity (Dityatev and Schachner, 2003; Kwok, Carulli and Fawcett, 2010; Tate, Tate and LaPlaca, 2007). Perineuronal nets (PNNs) are a specialized form of the brain ECM that display a lattice-like structure around the cell body and proximal dendrites of subtypes of neurons (Kwok *et al.*, 2011; McRae and Porter, 2012). This structure exerts essential roles in the stabilization of synapses, modulating developmental neural plasticity and brain maturation (Karetko and Skangiel-Kramaska, 2009; Wang and Fawcett, 2012). In addition, PNNs can exert protective functions, accumulating growth factors around certain neurons, acting as a buffering system for ions and protecting against oxidative stress (Brückner *et al.*, 1998; Morawski *et al.*, 2004).

Interactions of cells with components of the ECM are critical for the establishment and maintenance of stem cell self-renewal and differentiation. Laminin, for example was able to enhance human neural progenitor generation, expansion and differentiation into neurons and tenascin-C increased the growth and proliferation of CD34⁺ stem cells (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2011; Tucker *et al.*, 2013). A number of studies have associated fibronectin with astrocyte and oligodendrocyte proliferation (Goetschy *et al.*, 1987; Niquet *et al.*, 1994; Stoffels *et al.*, 2015). Similar effect of this ECM glycoprotein was observed in osteoblasts, fibroblasts and renal epithelial cells (Brückner *et al.*, 1998; Kwok *et al.*, 2011; Morawski *et al.*, 2004; Tate, Tate and LaPlaca,

2007). On the other hand, CSPGs consisting of a core protein and glycosaminoglycan chains, mainly act as barrier molecules affecting axon growth, cell migration and plasticity (Carulli *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2009).

Environmental conditions, can affect neural cells during brain development (Esteban-pretel *et al.*, 2013; Jiménez-Chillarón *et al.*, 2012; Spencer and Palmer, 2012). Malnutrition is an environmental insult that impair in several aspects the nervous system formation and maturation (Jiménez-Chillarón *et al.*, 2012; Morgane *et al.*, 1993; Vituri *et al.*, 2000). However, the consequence of malnutrition on the ECM were poorly studied throughout the last decades. Reif *et al.*, did not find modified levels of laminin and FN in the liver of rats submitted to perinatal dietary restriction for 15 weeks from conception (Reif *et al.*, 1993).

Nutritional restriction of tryptophan during the lactation period resulted in a lower level of axonal plasticity and a reduced activity of metalloproteinase 9 in the superior colliculus (Penedo *et al.*, 2009). In adult female rats or male mice higher levels of laminin and FN were detected in the ECM of bone marrow (Vituri *et al.*, 2000; Xavier *et al.*, 2007). Using a vitamin A deficiency dietary model, Swartz-Basile *et al.*, showed that cellular processes as apoptosis, proliferation and enterocytic migration were affected and these modifications were related to decreased levels of laminin (Swartz-Basile *et al.*, 2003). Esteban-Pretel *et al.*, using the same model of vitamin A deficiency, demonstrated increased collagen IV levels and decreased laminin and matrix metalloproteinases levels in the lung. Moreover, laminin and matrix metalloproteinases levels were not reverted when vitamin A was restored to the animals diet (Esteban-pretel *et al.*, 2013). On the other hand, Aguilar *et al.*, observed that a vitamin A deficiency promoted an increase on laminin, FN and collagen type IV levels on liver ECM (Aguilar *et al.*, 2008).

Taken together, these studies suggest that the effects of malnutrition are intrinsically related to the type of tissue, the developmental stage besides the kind of nutrient that is restricted. The effects of maternal malnutrition on the composition of the brain ECM and especially on the PNNs are not well understood. An early study showed that malnutrition of rats induced by restricted intake of food to 50% from pregnancy until 40th postnatal day increased CSPGs levels in brain homogenates (White and A, 1979).

Similar results were found by Manojkumar and Kurup in brain homogenates of weanling rats fed with a protein restricted diet for 30 days. These authors also detected increased activity of enzymes related to the catabolism of glycoproteins in the same animals (Manojkumar and Kurup, 1998). Taking into account the importance of ECM and PNNs, especially during early stages of

brain development, the present study was conducted to investigate whether a severe maternal malnutrition could impair fibronectin expression in astrocytes as well as CSPG-4 synthesis and PNNs formation in neurons and astrocytes of the progeny. It was hypothesized that modifications in the ECM composition could be involved in neuronal phenotypic changes induced by this type of nutritional insult in the cerebral cortex (Borba *et al.*, 2000).

Materials and Methods

Experimental Diet: The Regional Basic Diet

The Regional Basic Diet (RBD) is a multifactorial malnutrition model developed by researchers from the Federal University of Pernambuco (UFPE) during the 90's and is based on the feeding habits of low incoming human populations from the Northeast Brazil, as described by Teodósio *et al.*, 1990 (Medeiros *et al.*, 2008; Teodósio *et al.*, 1990). This diet induces a severe malnutrition similar to and has been used in several studies to evaluate neural effects of a severe malnutrition during brain development (Guedes *et al.*, 1987; Picanço-Diniz *et al.*, 1998; Borba *et al.*, 2000; Mendonça *et al.*, 2004; Vilella *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2008). The RBD was prepared with beans (*Phaseolus vulgaris*), manioc flour (*Manioc esculenta*), sweet potato (*Ipomoea batatas*) and dried-salted meat. As shown in Table 1 this diet is deficient in the lipids, minerals, and protein levels containing higher content of carbohydrates, when compared to a balanced commercial diet (Labina, Purina of Brazil) (Table 1).

Animals

Adult progenitor female Wistar rats (90 days of age) were randomly separated into Malnourished and Control groups fed with RBD and a commercial balanced diet, respectively. These rats started receiving the respective diets at mating, and were maintained on those diets during gestation. The offspring constituted the object of the present study. At parturition, litter size, total litter weight and mean birth weight of the pups were recorded. In the postnatal days, from the first until the third one, pups from different litters (2-3 per litter/group) were grouped to obtain cerebral cortex astrocyte primary cultures and mix cultures containing astrocytes and neurons, as described below. All procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research of

Federal University of Pernambuco (protocol #23076.056375/2012-98), which complies with the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH, Bethesda, USA).

Ingredients	G	Protein	Carbohydrate	Fat	Ash	Fibers	kcal %
Beans	18.34	3.99	10.66	0.24	0.57	1.09	60.76
Manioc flour	64.81	0.84	48.59	0.12	0.43	5.64	198.80
Deffated, dried,salted meat	3.74	2.74	-	0.06	0.06	-	11.50
Fat (from the meat)	0.35	-	-	0.35	-	-	3.15
Sweet potato	12.76	0.30	9.99	0.03	0.20	0.48	41.43
Total	100.00	7.87	69.24	0.80	1.26	7.21	315.64

Table 1. Composition of regional basic diet expressed as g/100g of diet. Beans, meat and sweet potato were cooked, dried and ground (Borba *et al.*, 2000).

Cell Cultures

Cortical astrocyte primary cultures

Primary cultures of astrocytes were prepared as described by Moura-Neto *et al.*, 1983(Moura Neto *et al.*, 1983). Pups from different litters per group were decapited and the cerebral cortex was dissected in phosphate buffer containing 0,6% glucose (PBS-glucose), followed by mechanic dissociation. Cell suspension was diluted in PBS-glucose plus Dulbecco’s modified Eagle’s medium and nutrient mixture F-12 (DMEM-F-12, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 33 mM glucose (Merck), 2 mM glutamine (Calbiochem), 3 mM sodium bicarbonate (Merck), 0,5mg/ml penicilin/streptomycin (Invitrogen), 2,5 µg/ml amphotericin (Sigma) and then centrifuged for 5 min (1,500 rpm). Cells were seeded in plastic bottles (25 cm³) and incubated in DMEM-F-12 medium, at 37°C in a humidified 5% CO₂-95% air atmosphere. The medium was replaced every 2-3 days. After 10 days in vitro (div) it was carried out the first passage of cells (P1), using tripsin (0.25% + EDTA %; Sigma) for 5 min. Cells were kept on P1 for 10 div and two subsequent passages (P2 and P3) were done in order to analyze fibronectin expression by Western blotting as described below.

Mixed neurons and astrocyte primary cultures

Mixed cultures of neurons and glial cells were prepared from neonates at the same age. In this case, primary cortical cultures were maintained for two days in DMEM-F12 with 10% of FBS and then, this medium was replaced by a mix of 50% of DMEM-F12 with 10% of FBS and 50% of Neurobasal medium (Gibco – Life Technologies) supplemented with 1% B27 serum (Gibco – Life Technologies). From the second change of medium, only half of the old medium was discarded, and the same volume was added of new medium and serum, remaining the proportion of 50% of each mix of medium and serum. In the 10th day after seeding, the cell cultures were fixed in paraformaldehyde 4% in phosphate buffer, 0.1 M, pH 7.4 for 20 minutes and then washed 3 times for posterior analysis by immunocytochemistry to visualize the formation of perineuronal nets and the presence of the chondroitin sulfate – 4, also called NG-2 in neurons and astrocytes.

Immuno and cytochemical assays

For immunocytochemical assays, fixed mixed cultures with 10 div were firstly blocked for 1 hour in PB-saline, pH 7.4 (PBS) containing 10% normal goat serum. Then, were incubated in mouse monoclonal chondroitin sulfate–4 monoclonal antibody (Millipore; 1:500) overnight at 4°C. After several washes in PBS, cultures were treated with biotinylated secondary antibody goat anti-mouse (Jackson Lab.; 1:1000 diluted in PBS), for 1 h, and then in streptavidin (Sigma, 1:500) diluted in PBS for 1 hour. Immunostaining was visualized using the chromogen diaminobenzidine (Sigma, 2.5 µg/ml + H₂O₂ 0.03% in PBS 0.1M).

In order to visualize the presence of glycosaminoglycans from the perineuronal nets in the mixed cultures, cytochemistry for biotinylated *Wisteria floribunda* (Vector Labs) and *Vicia villosa* (Santa Cruz Biotechnology) lectins were carried out. In these cases, cultures were firstly treated with 0.3% H₂O₂ in methanol for 20 minutes. After several washes in PBS + triton X 100, cells were incubated overnight at 4°C in solutions containing 10 µg/ml PBS of biotinylated *Wisteria floribunda* or *Vicia villosa* lectin. After several washes, they were incubated in streptavidin (Sigma, 1:500 in PBS) for 1 hour. Diaminobenzidine (Sigma, 2.5 µg/ml + H₂O₂ 0.03% in PBS 0.1M) was used as chromogen. Digital images of the mixed cultures were obtained using an inverted Microscope (Leica) coupled to a digital camera (Moticam).

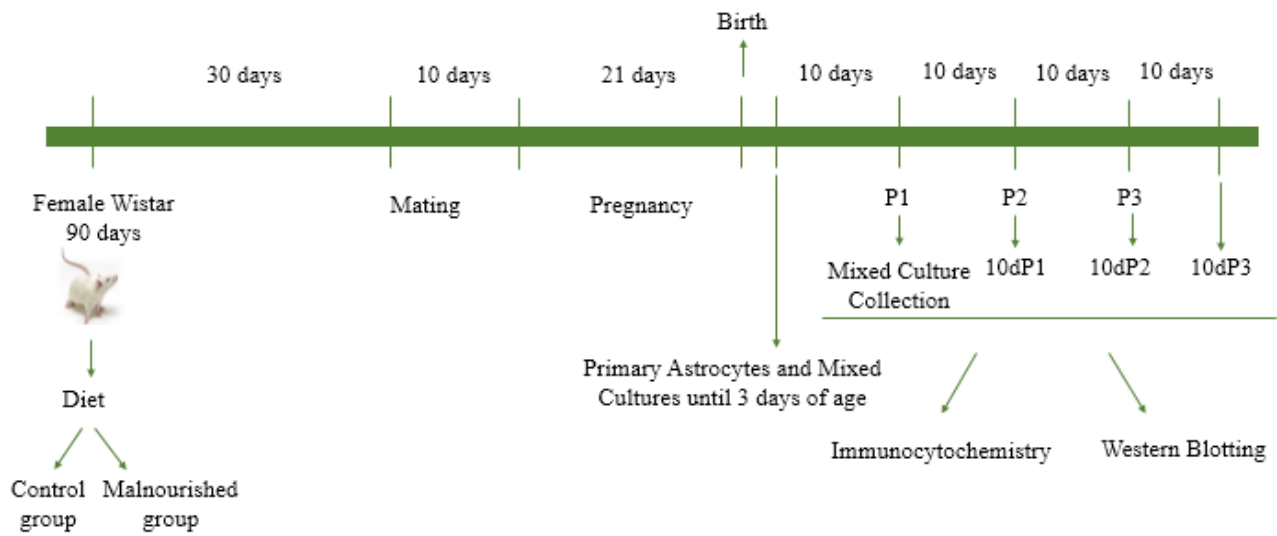


Figure 1. Methodological design to diagram the sequence of steps followed.

Results

Expression of fibronectin levels in cortical astrocyte primary cultures

Fibronectin protein levels were detected in homogenates of cortical astrocytes in the three different stages of culture maturation *in vitro*. A similar expression profile was detected when malnourished and control groups were compared. Densitometric results of the area under the curve are shown in the Figure 2 A-C.

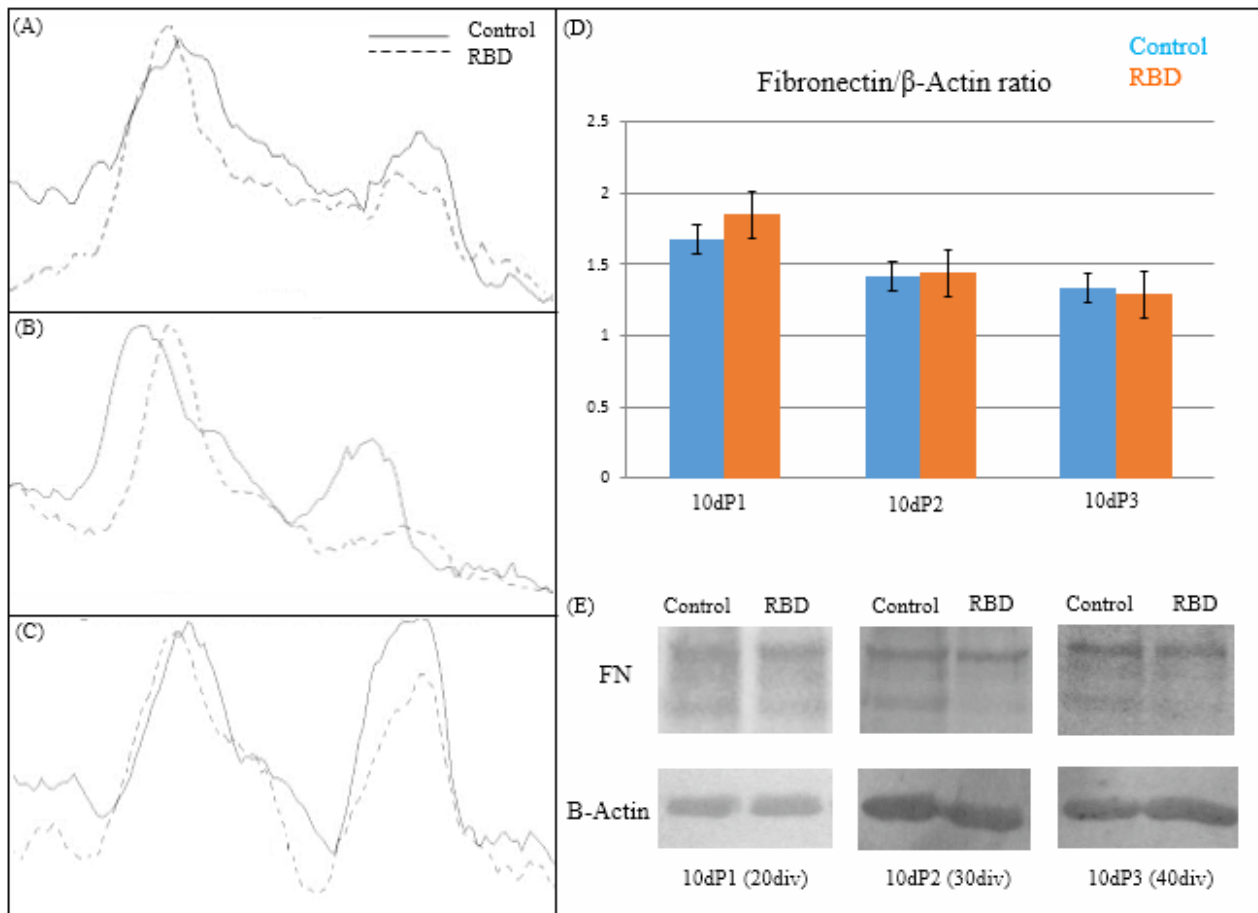


Figure 2. Western blotting to fibronectin. Samples (50µg/lane) were separated by SDS-PAGE under reducing conditions followed by electrotransfer onto nitrocellulose membranes for immunodetection of fibronectin (E). (A-C) Densitometric measurement was performed and the differences between the area under the curve are shown. The solid line refers to the control sample and the dashed line refers to the malnourished sample. Densitometric curve of fibronectin from 10dP1 (A), 10dP2 (B) and 10dP3 (C) cultures. (D) Media of the area under the curve from the three ages of cultures and no difference was found.

Expression of chondroitin sulphate-4 proteoglycan in cerebral cortex mixed culture

Qualitative analysis of CSPG-4 immunoreactivity in several fields of mixed cultures demonstrated lower number of neurons and astrocytes expressing this ECM component in the malnourished group as compared to the control condition. Figure 3 shows representative fields/group of these cultures.

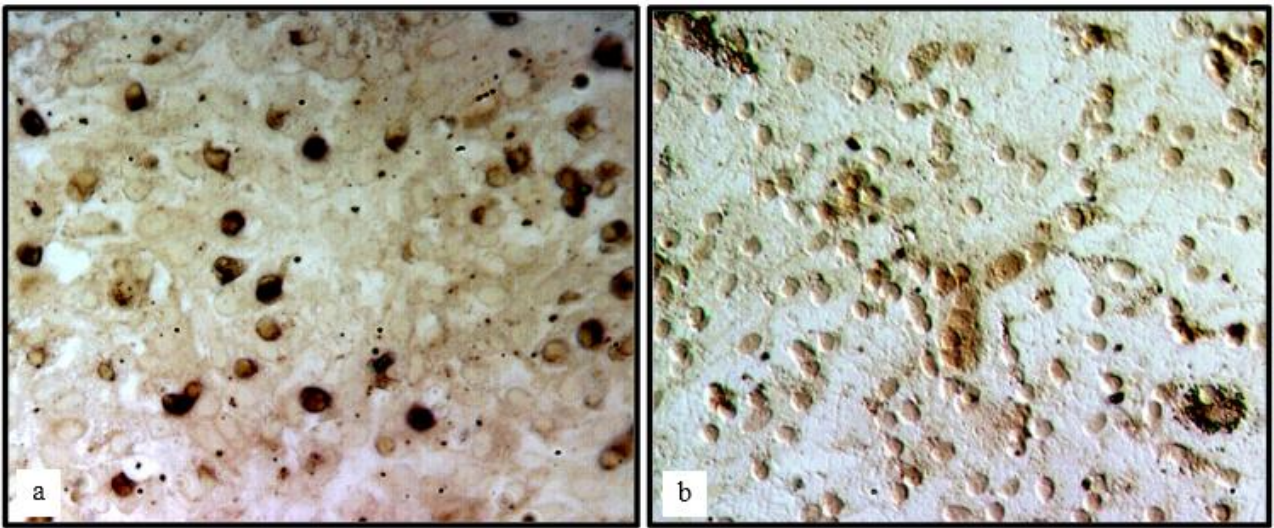


Figure 3. Chondroitin sulphate-4 expression in mixed cultures 20x. (a) Control cultures. (b) Cultures from malnourished pups. Notice the different distribution of the assembly of CSPG-4 on both cultures. The malnourished one seems be lower present than in the control group.

Perineuronal nets in cerebral cortex mixed culture

Figure 4A-B shows detection of PNNs accumulated in neurons and astrocytes after 10 days *in vitro* via *Wisteria floribunda* agglutinin binding. While in the control cultures this binding occurs in several cells per field, defining the outline of neurons as well as is present in the cytoplasm of astrocytes, in the malnourished cultures, the formation of PNNs seems to be impaired at least in two aspects: lower number of cells are labeled by this lectin and an apparent disorganization of this net is detected in positive cells and in extracellular spaces. Similar findings were detected using the lectin *Vicia villosa* staining (Fig. 4C-D)

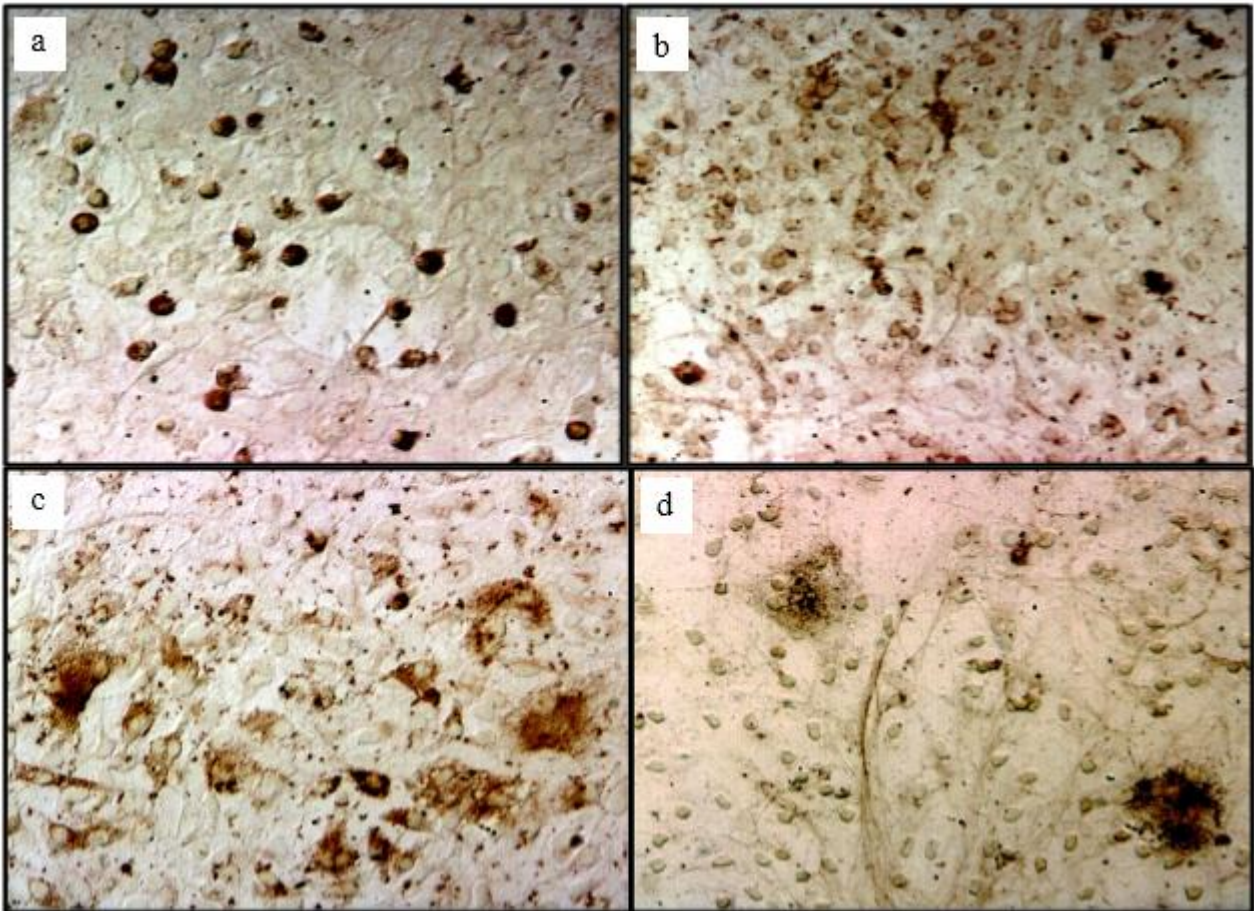


Figure 4. (a) and (b) *Wisteria floribunda* agglutinin expression in mixed cultures 20x. (c) and (d) *Vicia villosa* agglutinin expression. In mixed cultures 20x (a) and (c) are control cultures. (b) and (d) are cultures from malnourished pups. Emphasis for the disorganized expression of both agglutinins in the malnourished cultures.

Discussion

The main finding of this study is that a severe maternal malnutrition induced modifications in the expression profile of some ECM components in cortical astrocytes and neurons of neonates. The lack of intergroup difference in the FN protein levels in astrocytes cultures kept *in vitro* for 20, 30 and 40 days deserve some consideration. FN is a large adhesive glycoprotein widely distributed in the brain ECM, especially during development where it is present in loose cellular spaces in immature nervous tissue. This glycoprotein contains multiple domains that mediate bindings to other ECM components and integrin receptors (Bradshaw and Smith, 2014). During brain embryogenesis, FN is distributed along radial glia of cerebral cortex and plays important role in

neuronal adhesion, migration and differentiation (Boison *et al.*, 1995). It is synthesized and secreted by astrocytes, inducing neurite outgrowth in several brain regions (Cohen *et al.*, 1987; Lefcort *et al.*, 2009). The present findings showing similar fibronectin levels in early postnatal days of cortical astrocyte development, contrast with data obtained in brain homogenates of young rats submitted to food restriction for 30 days from weaning (Manojkumar and Kurup, 1998). According to this later study, lower levels of glycoproteins occurred in parallel to an increase in the activity of enzymes related to their catabolism.

The inexistence of modifications in the FN content in astrocyte cultures suggest that despite the severe maternal malnutrition, the synthesis or deposition of this glycoprotein in the ECM was not impaired at early stages of brain development. Pre and/or postnatal malnutrition have been associated to short and long-term anomalies in the neuronal morphology in the cerebral cortex and other brain regions (Durán *et al.*, 2008; Morgane, Mokler and Galler, 2002; Morgane *et al.*, 1993). Borba *et al.*, using RBD during gestation and lactation period detected smaller soma areas of cortical neurons in young (43th postnatal day) malnourished rats compared to the control cases, but reported an expressive morphological plasticity in the dendritic complexity of these cells. Recent evidence obtained in our laboratory also indicate that when embryonic neurons of RDB malnourished animals were cultured over malnourished astrocytes, the neurite outgrowth was similar to that observed in the control co-cultures where both neurons and astrocytes were obtained from animals with adequate nutritional condition.

Neuronal plasticity and differentiation during brain development and maturity have been negatively related to the concentration of CSPGs in the ECM (Snow and Letourneau, 1992). Such molecules are the most abundant type of proteoglycans expressed in the mammalian central nervous system. Compared to the control group, lower number of cells labeled for the chondroitin sulphate-4 was here detected in the mixed cultures of malnourished neonates after 10 days *in vitro*. This data at early stages of neural development contrast with it was reported in 40-days old rats chronically malnourished by 50% intake food during gestation and lactation periods (White and A, 1979). According to this study, increased levels (2.5 times) of total chondroitin sulphate was detected in brain homogenates of the malnourished animals while little variation in heparan sulphate content was observed. Manojkumar and Kurup, also detected increased levels of most of the glycosaminoglycans in brain homogenates of young rats fed with a protein deficient diet for 30 days from weaning, in spite of an increased activity of catabolizing enzymes for these proteins (Manojkumar and Kurup, 1998).

During postnatal development, CSPGs progressively accumulate around soma and dendrites of subtypes of neurons, contributing to the formation of the PNNs (Celio *et al.*, 1998; Qing-long, Qian and Xiao-hui, 2014). CSPGs mainly act as barrier molecules affecting axon growth, cell migration and early plasticity but are also very important after axonal injury in the mature CNS and for functional plasticity mechanisms such as long term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) (Carulli *et al.*, 2005; Rhodes and Fawcett, 2004; Siebert, Conta Steencken and Osterhout, 2014). In the present study, the lower number of cells expressing chondroitin sulphate-4 in mixed cultures of malnourished group occurred simultaneously to a modified formation of PNNs.

In the control cultures, binding for *Wisteria floribunda* and *Vicia villosa* lectins were detected in most of neurons and in some astrocytes. This labeling was characterized by a dense PNN especially over the cell bodies. In cultures of malnourished group there is lower number of cells labeled for both lectins and the labeling pattern was disorganized or fragmented around the cell bodies. The cellular repercussion of maternal malnutrition on the expression of brain ECM components and PNN formation have not been yet investigated. Recent evidence from our lab has shown morphological phenotype plasticity of embryonic neurons of RBD malnourished animals when they are co-cultured with astrocytes of well-nourished animals. Morphometric analysis of these cells showed a significant lower axonal length while higher number of dendrites emerging of the neuronal soma was detected (Pimentel *et al.*, data not published). Although the mechanisms involved in these changes are not yet completely understood, it is possible speculate that ECM modifications detected here could have some influence in the neuronal phenotypic plasticity recently observed in our co-cultures (Pimentel *et al.* data not published). A lower expression of the chondroitin sulphate-4 and PNNs formation could favor a higher neuronal dendritic complexity as was recently demonstrated *in vitro* using chondroitinase (Matthews, 2012).

Altogether, the present findings suggest that a severe maternal malnutrition induced by a multinutrient deficiency modifies the ability of astrocytes and neurons to develop an adequate ECM during early stages of brain maturation. It is not clear at this moment whether these changes are a consequence of a delayed stage of brain development. Future studies will be done in order to address this question, especially taken into account that malnutrition early in life can induce permanent effects on the brain plasticity and maturation (Prado and Dewey, 2014).

6. CONCLUSÕES

O presente teve como principal objetivo analisar as repercussões de uma desnutrição multifatorial sobre componentes da matriz extracelular do córtex cerebral, bem como sobre componentes das redes perineuronais, considerando que os mesmos estão relacionados aos processos de proliferação e diferenciação de astrócitos e neurônios.

A análise de neurônios e astrócitos mantidos em cultura indicam alterações morfológicas e funcionais em astrócitos provenientes de neonatos cujas mães foram submetidas à uma dieta multideficiente 30 dias antes e durante o período de gestação. A análise do crescimento neurítico e da arborização dendrítica de neurônios sobre astrócitos, sendo ambos oriundos de animais com diferentes condições nutricionais, mostrou respostas adaptativas em relação ao crescimento neuronal. No entanto, modificações na ramificação neurítica e na complexidade destes prolongamentos foram observadas quando os neurônios foram cultivados sobre astrócitos provenientes de mães com diferente *status* nutricional.

Os resultados obtidos indicam que os níveis proteicos de fibronectina nos astrócitos não foram afetados pela condição nutricional materna, em comparação ao grupo controle. Considerando a importância da fibronectina, produzida pelos astrócitos, sobre o crescimento dendrítico e axonal dos neurônios, os resultados ora obtidos parecem ser coerentes com os dados obtidos nas co-culturas de neurônios desnutridos sobre astrócitos desnutridos, as quais não apresentaram diferenças no crescimento neurítico quando comparados às co-culturas de neurônios e astrócitos normonutridos.

Por outro lado, os dados preliminares da distribuição das redes perineuronais nas culturas mistas mostrando uma menor expressão das mesmas nas culturas de animais desnutridos sugere um atraso na formação das redes perineuronais nos animais desnutridos quando comparado ao observado nas culturas de animais controle. As culturas mistas analisadas correspondem a um córtex cerebral aos 13 dias de vida pós-natal, período no qual os componentes das redes ainda estão sendo sintetizados pelos astrócitos e neurônios em sua totalidade.

É necessário salientar o fato de que neurônios e astrócitos podem ser afetados de modo distinto em situações de desnutrição ou outros insultos ambientais. Esse fato pode ser exemplificado no presente trabalho, onde astrócitos foram influenciados pela desnutrição multifatorial severa apresentando alterações na expressão de seus filamentos intermediários, contudo sem demonstrar modificações na sua produção de fibronectina para a matriz extracelular. Enquanto os neurônios,

apesar de não terem sua complexidade e arborização dendrítica influenciadas pelo mesmo insulto nutricional, não foram capazes de produzir e/ou expressar os componentes das redes perineuronais como os neurônios do grupo controle.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. C.; WATT, F. M. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. **Development (Cambridge, England)**, v. 117, n. 4, p. 1183–98, abr. 1993.

AGUILAR, R. P. *et al.* Vitamin A deficiency injures liver parenchyma and alters the expression of hepatic extracellular matrix. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. November 2008, p. 214–222, 2008.

ALLEN, N. J. Role of glia in developmental synapse formation. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, p. 1027–1033, 2013.

ALMEIDA, M. F. L. *et al.* Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted to a multideficient diet. **Nutritional neuroscience**, v. 8, n. 2, p. 91–9, abr. 2005.

ANTONOW-SCHLORKE, I. *et al.* Vulnerability of the fetal primate brain to moderate reduction in maternal global nutrient availability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 7, p. 3011–6, 15 fev. 2011.

BARBER, T. *et al.* Vitamin A Deficiency and Alterations in the Extracellular Matrix. **Nutrients**, v. 6, p. 4984–5017, 2014.

BARROS, C. S.; FRANCO, S. J.; MÜLLER, U. Extracellular matrix: functions in the nervous system. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 1, p. a005108, jan. 2011.

BARTUS, K. *et al.* Chondroitin sulphate proteoglycans: Key modulators of spinal cord and brain plasticity. **Experimental Neurology**, v. 235, n. 1, p. 5–17, 2012.

BENTON, D. The influence of dietary status on the cognitive performance of children. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 4, p. 457–70, abr. 2010.

BERGSTROM, T. *et al.* Developmentally regulated collagen/integrin interactions confer adhesive properties to early postnatal neural stem cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2526–2532, 2014.

BIXBY, J. L. Protein kinase C is involved in laminin stimulation of neurite outgrowth. **Neuron**, v. 3, n. 3, p. 287–97, set. 1989.

BOISON, D. *et al.* Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. August, p. 5502–5513, 1995.

BORBA, J. M. *et al.* Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. **Brain research bulletin**, v. 53, n. 2, p. 193–201, 15 set. 2000.

BRADSHAW, M. J.; SMITH, M. L. Multiscale relationships between fibronectin structure and functional properties. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 4, p. 1524–1531, 2014.

BRÜCKNER, G. *et al.* Acute and long-lasting changes in extracellular-matrix chondroitin-sulphate proteoglycans induced by injection of chondroitinase ABC in the adult rat brain. **Experimental brain research**, v. 121, n. 3, p. 300–10, ago. 1998.

CALDERON, F.; KIM, H. Y. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, p. 979–988, 2004.

CARULLI, D. *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. **Current opinion in neurobiology**, v. 15, n. 1, p. 116–20, fev. 2005.

____. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. **The Journal of comparative neurology**, v. 494, n. 4, p. 559–77, 1 fev. 2006.

CAVALCANTE, L. A *et al.* Modulators of axonal growth and guidance at the brain midline with special reference to glial heparan sulfate proteoglycans. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 4, p. 691–716, dez. 2002.

CELIO, M. R. *et al.* Perineuronal nets: past and present. **Trends in neurosciences**, v. 21, n. 12, p. 510–5, dez. 1998.

CHANG, C.-Y.; KE, D.-S.; CHEN, J.-Y. Essential fatty acids and human brain. **Acta neurologica Taiwanica**, v. 18, n. Table 1, p. 231–241, 2009.

CHEN, W.-C.; LIN, H.-H.; TANG, M.-J. Regulation of proximal tubular cell differentiation and proliferation in primary culture by matrix stiffness and ECM components. **American journal of physiology. Renal physiology**, 23 jul. 2014.

CHIQUET-EHRISMANN, R.; TUCKER, R. P. Tenascins and the importance of adhesion modulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, p. 1–19, 2011.

CINTRA, L. *et al.* Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. **Brain research**, v. 532, p. 271–277, 1990.

COHEN, J. *et al.* The role of laminin and the laminin/fibronectin receptor complex in the outgrowth of retinal ganglion cell axons. **Developmental biology**, v. 122, n. 2, p. 407–18, ago. 1987.

COLES, C. H. *et al.* Proteoglycan-specific molecular switch for RPTo Clustering and neuronal extension. **Science**, v. 332, n. 6028, p. 484–488, 2012.

COTI BERTRAND, P.; O'KUSKY, J. R.; INNIS, S. M. Maternal dietary (n-3) fatty acid deficiency alters neurogenesis in the embryonic rat brain. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. January, p. 1570–1575, 2006.

CUA, R. C. *et al.* Overcoming neurite-inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans in the astrocyte matrix. **Glia**, v. 61, n. 6, p. 972–84, jun. 2013.

CZOPKA, T. *et al.* Tenascin C and tenascin R similarly prevent the formation of myelin membranes in a RhoA-dependent manner, but antagonistically regulate the expression of myelin basic protein via a separate pathway. **Glia**, v. 57, n. 16, p. 1790–801, dez. 2009.

DAS, U. N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. **Biotechnology journal**, v. 1, n. 4, p. 420–39, abr. 2006.

DEEPA, S. S. *et al.* Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 26, p. 17789–800, 30 jun. 2006.

DEMAIS, V. *et al.* Diversity of bone matrix adhesion proteins modulates osteoblast attachment and organization of actin cytoskeleton. **Morphologie : bulletin de l'Association des anatomistes**, v. 98, n. 321, p. 53–64, jun. 2014.

DITYATEV, A.; SCHACHNER, M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 6, p. 456–68, jun. 2003.

DOU, C. L.; LEVINE, J. M. Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 14, n. 12, p. 7616–28, dez. 1994.

DURÁN, P. *et al.* Protein malnutrition and aging affects entraining and intensity of locomotor activity and body temperature circadian rhythms in rats. **Nutritional neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 263–268, 2008.

ECKER, J. *et al.* The conjugated linoleic acid isomer trans-9,trans-11 is a dietary occurring agonist of liver X receptor α . **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, n. 4, p. 660–666, 2009.

ESTEBAN-PRETEL, G. *et al.* Vitamin A deficiency disturbs collagen IV and laminin composition and decreases matrix metalloproteinase concentrations in rat lung . Partial reversibility by retinoic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 137–145, 2013.

FAISSNER, A. *et al.* Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. **Brain research reviews**, v. 63, n. 1-2, p. 26–38, maio 2010.

FEOLI, A. M. *et al.* Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 22, n. 2, p. 160–5, mar. 2006.

FEOLI, A. M. *et al.* Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. **Brain research**, v. 1187, p. 33–41, 2 jan. 2008.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of cell science**, v. 123, p. 4195–4200, 2010.

FREEMAN, M. R. Specification and morphogenesis of astrocytes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6005, p. 774–8, 5 nov. 2010.

FUKUI, K. *et al.* Vitamin E deficiency induces axonal degeneration in mouse hippocampal neurons. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 58, n. 6, p. 377–83, jan. 2012.

GALTREY, C. M.; FAWCETT, J. W. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. **Brain research reviews**, v. 54, n. 1, p. 1–18, abr. 2007.

GEISLER, M. *et al.* Primary hippocampal neurons, which lack four crucial extracellular matrix molecules, display abnormalities of synaptic structure and function and severe deficits in perineuronal net formation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 18, p. 7742–55, 1 maio 2013.

GEORGIEFF, M. K. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. **The American journal of clinical nutrition**, v. 85, n. 2, p. 614S–620S, fev. 2007.

GOETSCHY, J. F. *et al.* Fibronectin and collagens modulate the proliferation and morphology of astroglial cells in culture. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 63–70, 1987.

GRESSENS, P. *et al.* Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. **Brain research. Developmental brain research**, v. 103, n. 1, p. 21–35, 20 out. 1997.

GU, W.-L. *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycans regulate the growth, differentiation and migration of multipotent neural precursor cells through the integrin signaling pathway. **BMC Neuroscience**, v. 10, p. 128 – 143, 2009.

GUESNET, P.; ALESSANDRI, J. M. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. **Biochimie**, v. 93, n. 1, p. 7–12, 2011.

HAGGARTY, P. Fatty acid supply to the human fetus. **Annual review of nutrition**, v. 30, p. 237–255, 2010.

HU, J. *et al.* Effects of extracellular matrix molecules on the growth properties of oligodendrocyte progenitor cells in vitro. **Journal of neuroscience research**, v. 87, n. 13, p. 2854–62, out. 2009.

JENSEN, C. J.; MASSIE, A.; KEYSER, J. DE. Immune players in the CNS: The astrocyte. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, p. 824–839, 2013.

JIMÉNEZ-CHILLARÓN, J. C. *et al.* The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. **Biochimie**, v. 94, n. 11, p. 2242–2263, 2012.

JOHN, N. *et al.* Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 31, n. 4, p. 774–84, abr. 2006.

KALKREUTH, R. H. *et al.* Fibronectin stimulates migration and proliferation , but not chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells. **Regenerative Medicine**, v. 9, n. 6, p. 759–773, 2014.

KARETKO, M.; SKANGIEL-KRAMSKA, J. Diverse functions of perineuronal nets. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 69, n. 4, p. 564–77, jan. 2009.

KETTENMANN, H.; VERKHRATSKY, A. Neuroglia: the 150 years after. **Trends in neurosciences**, v. 31, n. 12, p. 653–9, dez. 2008.

KIM, S. H.; TURNBULL, J.; GUIMOND, S. Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **Journal of Endocrinology**, v. 209, p. 139–151, 2011.

KWOK, J. C. F. *et al.* Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. **Developmental Neurobiology**, v. 71, p. 1073–1089, 2011.

KWOK, J. C. F.; CARULLI, D.; FAWCETT, J. W. In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. **Journal of neurochemistry**, v. 114, n. 5, p. 1447–59, 1 set. 2010.

LEE, H. *et al.* Doxycycline inhibits matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation after transient global cerebral ischemia. **Neurobiology of disease**, v. 34, n. 2, p. 189–98, maio 2009.

LEFCORT, F. *et al.* Regulation of expression of fibronectin and its receptor, $\alpha 5 \beta 1$, during development and regeneration of peripheral nerve. **Development**, v. 116, n. 3, p. 767–782, 2009.

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

LEVITSKY, D. A.; STRÄEPP, J.; JNUERSITY, C. The Relationship between Undernutrition and Behavioral Development in Children Malnutrition and the Brain : Changing Concepts , Changing Concerns1. p. 2212–2220, 1995.

LIESI, P.; DAHL, D.; VAHERI, A. Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. **The Journal of cell biology**, v. 96, n. 3, p. 920–4, mar. 1983.

LIZÁRRAGA-MOLLINEDO, E. *et al.* Early undernutrition increases glycogen content and reduces the activated forms of GSK3, AMPK, p38 MAPK, and JNK in the cerebral cortex of suckling rats. **Journal of neurochemistry**, v. 112, n. 1, p. 123–33, jan. 2010.

MADORE, C. *et al.* Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. **Brain, behavior, and immunity**, p. 1–10, 13 abr. 2014.

MANOJKUMAR, V.; KURUP, P. A. Changes in the Glycosaminoglycans and Glycoproteins in the Rat Brain during Protein Calorie Malnutrition. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 25, p. 149–157, 1998.

MARTINS, V. J. B. *et al.* Long-lasting effects of undernutrition. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 6, p. 1817–46, jun. 2011.

MASSOVA, I. *et al.* Matrix metalloproteinases : structures , evolution , and ABSTRACT. p. 1075–1095, [s.d.].

MATTHEWS, K. A. G. AND R. T. Deconstructing the perineuronal net: cellular contributions and molecular composition of the neuronal extracellular matrix. **Neuroscience**, v. 218, p. 367–384, 2012.

MCRAE, P. A.; PORTER, B. E. The Perineuronal Net Component of the Extracellular Matrix on the Plasticity and Epilepsy. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 7, p. 963–972, 2012.

MEDEIROS, M. DO C. *et al.* History of Regional Basic Diet (RBD) - a dietary model of experimental malnutrition. **Neurobiologia**, v. 71, n. 4, p. 53–70, 2008.

MELOTY-KAPELLA, C. V *et al.* Effects of tenascin-W on osteoblasts in vitro. **Cell and tissue research**, v. 334, n. 3, p. 445–55, dez. 2008.

MENDES DE AGUIAR, C. B. N. *et al.* Undersulfation of proteoglycans and proteins alter C6 glioma cells proliferation, adhesion and extracellular matrix organization. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 20, n. 7, p. 563–71, nov. 2002.

MENDONÇA, J. E. F. *et al.* GFAP expression in astrocytes of suprachiasmatic nucleus and medial preoptic area are differentially affected by malnutrition during rat brain development. **Nutritional neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 223–34, ago. 2004.

MEYER, S.; SCHMIDT, I.; KLÄMBT, C. Glia ECM interactions are required to shape the *Drosophila* nervous system. **Mechanisms of Development**, v. 3, 2014.

MONTANHA-ROJAS, E. A *et al.* Myelin basic protein accumulation is impaired in a model of protein deficiency during development. **Nutritional neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 49–56, fev. 2005.

MORAWSKI, M. *et al.* Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. **Experimental neurology**, v. 188, n. 2, p. 309–15, ago. 2004.

MORAWSKI, M. *et al.* Aggrecan: Beyond cartilage and into the brain. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 5, p. 690–3, maio 2012.

MORGANE, P. J. *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 17, p. 91–128, 1993.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 26, n. 4, p. 471–83, jun. 2002.

MOURA NETO, V. *et al.* Microheterogeneity of tubulin proteins in neuronal and glial cells from the mouse brain in culture. **The EMBO journal**, v. 2, n. 8, p. 1243–1248, 1983.

NIQUET, J. *et al.* Proliferative astrocytes may express fibronectin-like protein in the hippocampus of epileptic rats. **Neuroscience Letters**, v. 180, p. 13–16, 1994.

OHTAKE, Y.; LI, S. Molecular mechanisms of scar-sourced axon growth inhibitors. **Brain Research**, p. 1–14, 2014.

PARFENOVA, H. *et al.* Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 290, p. C1399–C1410, 2006.

PENEDO, L. A. *et al.* Nutritional tryptophan restriction impairs plasticity of retinotectal axons during the critical period. **Experimental neurology**, v. 217, n. 1, p. 108–115, maio 2009.

PIRES, R. G. W. *et al.* Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: a study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Behavioural brain research**, v. 162, n. 1, p. 11–21, 1 jul. 2005.

PLANTMAN, S. Proregenerative properties of ECM molecules. **BioMed research international**, v. 2013, n. Iii, p. 981695, jan. 2013.

PRADO, E. L.; DEWEY, K. G. Nutrition and brain development in early life. **Nutrition reviews**, v. 72, n. 4, p. 267–84, abr. 2014.

PROPERZI, F.; ASHER, R. A; FAWCETT, J. W. Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. **Biochemical Society transactions**, v. 31, p. 335–336, 2003.

QING-LONG, M.; QIAN, Y. E.; XIAO-HUI, Z. Perineuronal net , CSPG receptor and their regulation of neural plasticity. **Acta Physiologica Sinica**, v. 66, n. 2011, p. 387–397, 2014.

RANADE, S. C. *et al.* Early protein malnutrition disrupts cerebellar development and impairs motor coordination. **The British journal of nutrition**, v. 107, n. 8, p. 1167–75, abr. 2012.

RAUCH, U.; FENG, K.; ZHOU, X. Cellular and Molecular Life Sciences Neurocan : a brain chondroitin sulfate proteoglycan. v. 58, p. 1842–1856, 2001.

REIF, S. *et al.* Perinatal Food Restriction in Rats Reduces the Content but Not Concentration of Liver Extracellular Matrix Proteins. **The Journal of nutrition**, n. December 1992, p. 811–816, 1993.

RHODES, K. E.; FAWCETT, J. W. Chondroitin sulphate proteoglycans: Preventing plasticity or protecting the CNS? **Journal of Anatomy**, v. 204, p. 33–48, 2004.

RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. January, p. 511–533, 2000.

RICHETTO, J.; RIVA, M. A. Prenatal maternal factors in the development of cognitive impairments in the offspring. **Journal of reproductive immunology**, 12 abr. 2014.

RICKS, C. B. *et al.* Extracellular matrices , artificial neural scaffolds and the promise of neural regeneration. v. 9, n. 17, p. 1573–1577, 2014.

ROSALES, F. J.; REZNICK, J. S.; ZEISEL, S. H. Understanding the role of nutrition in the brain & behavioral development of toddlers and preschool children: Identifying and overcoming methodological barriers. **Nutritional neuroscience**, v. 12, n. 5, p. 190–202, 2009.

ROTTA, L. N. *et al.* Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. **Neurochemical research**, v. 28, n. 8, p. 1181–6, ago. 2003.

ROZARIO, T. *et al.* The physical state of fibronectin matrix differentially regulates morphogenetic movements in vivo. **Developmental Biology**, v. 327, n. 2, p. 386–398, 2009.

SALAS, M. *et al.* Effects of perinatal undernutrition on the development of neurons in the rat insular cortex. **Nutritional neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 20–5, set. 2012.

SATO, Y. *et al.* A highly sulfated chondroitin sulfate preparation, CS-E, prevents excitatory amino acid-induced neuronal cell death. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, p. 1565–1576, 2008.

SCHAFER, D. P.; LEHRMAN, E. K.; STEVENS, B. The “quad-partite” synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 24–36, jan. 2013.

SEVILLA, C. A; DALECKI, D.; HOCKING, D. C. Regional fibronectin and collagen fibril co-assembly directs cell proliferation and microtissue morphology. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77316, jan. 2013.

SHEN, Y. Traffic lights for axon growth: Proteoglycans and their neuronal receptors. **Neural Regeneration Research**, v. 9, n. 4, p. 356–361, 2014.

SHINTO, L. *et al.* The effects of omega-3 Fatty acids on matrix metalloproteinase-9 production and cell migration in human immune cells: implications for multiple sclerosis. **Autoimmune diseases**, v. 2011, p. 134592, jan. 2011.

SIEBERT, J. R.; CONTA STEENCKEN, A.; OSTERHOUT, D. J. Chondroitin Sulfate Proteoglycans in the Nervous System: Inhibitors to Repair. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–15, 2014.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 365–379, 2002.

SMITH-THOMAS, L. C. *et al.* An inhibitor of neurite outgrowth produced by astrocytes. **Journal of cell science**, v. 107 (Pt 6, p. 1687–95, jun. 1994.

SNOW, D. M.; LETOURNEAU, P. C. Neurite outgrowth on a step gradient of chondroitin sulfate proteoglycan (CS-PG). **Journal of Neurobiology**, v. 23, n. 3, p. 322–336, 1992.

SOLEMAN, S. *et al.* Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. **Neuroscience**, v. 253, p. 194–213, 3 dez. 2013.

SONNTAG, M. *et al.* Perineuronal nets in the auditory system. **Hearing Research**, n. January, p. 1–12, 2015.

SOTTILE, J.; HOCKING, D. C.; SWIATEK, P. J. Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth. **Journal of cell science**, v. 111 (Pt 1, p. 2933–43, out. 1998.

SOUZA, A. S. DE *et al.* Brain fatty acid profiles and spatial learning in malnourished rats: effects of nutritional intervention. **Nutritional neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 119–27, jun. 2008.

SPENCER, P. S.; PALMER, V. S. INTERRELATIONSHIPS OF UNDERNUTRITION AND NEUROTOXICITY : FOOD FOR THOUGHT AND RESEARCH ATTENTION. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 605–616, 2012.

STOFFELS, J. M. J. *et al.* The EIIIA domain from astrocyte-derived fibronectin mediates proliferation of oligodendrocyte progenitor cells following CNS demyelination. **Glia**, v. 63, p. 242–256, 2015.

SUGAHARA, K. *et al.* Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, p. 612–620, 2003.

SUNDRANI, D. P. *et al.* Altered metabolism of maternal micronutrients and omega 3 fatty acids epigenetically regulate matrix metalloproteinases in preterm pregnancy: A novel hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 77, n. 5, p. 878–883, 2011.

SUTTKUS, A. *et al.* Neuroprotection against iron-induced cell death by perineuronal nets - an in vivo analysis of oxidative stress. **American journal of neurodegenerative disease**, v. 1, n. 2, p. 122–9, jan. 2012.

SWARTZ-BASILE, D. A. *et al.* Vitamin A deficiency inhibits intestinal adaptation by modulating apoptosis, proliferation, and enterocyte migration. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 285, n. 6, p. 424–432, jul. 2003.

SYKOVA, E. Astrocytes and extracellular matrix in extrasynaptic volume transmission. 2014.

TAKUMA, K.; BABA, A.; MATSUDA, T. Astrocyte apoptosis: Implications for neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, v. 72, p. 111–127, 2004.

TAM, O.; INNIS, S. M. Dietary polyunsaturated fatty acids in gestation alter fetal cortical phospholipids, fatty acids and phosphatidylserine synthesis. **Developmental neuroscience**, v. 28, n. 3, p. 222–9, jan. 2006.

TATE, C. C.; TATE, M. C.; LAPLACA, M. C. Fibronectin and laminin increase in the mouse brain after controlled cortical impact injury. **Journal of neurotrauma**, v. 24, n. 1, p. 226–30, jan. 2007.

TEODÓSIO, N. R. *et al.* A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. XL, n. 4, p. 533–547, 1990.

TOM, V. J. *et al.* Astrocyte-associated fibronectin is critical for axonal regeneration in adult white matter. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 42, p. 9282–90, 20 out. 2004.

TONGE, D. A *et al.* Fibronectin supports neurite outgrowth and axonal regeneration of adult brain neurons in vitro. **Brain research**, v. 1453, p. 8–16, 9 maio 2012.

TSANG, K. Y. *et al.* The developmental roles of the extracellular matrix: Beyond structure to regulation. **Cell and Tissue Research**, v. 339, p. 93–110, 2010.

TSIEN, R. Y. Very long-term memories may be stored in the pattern of holes in the perineuronal net. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. 12456–61, 2013.

TUCKER, R. P. *et al.* Tenascin-C and tenascin-W in whisker follicle stem cell niches: possible roles in regulating stem cell proliferation and migration. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 22, p. 5111–5, 15 nov. 2013.

UAUY, R.; DANGOUR, A. D. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. **Nutrition reviews**, v. 64, n. 5 Pt 2, p. S24–33; discussion S72–91, maio 2006.

VILELA, M. C. R. *et al.* Differential vulnerability of the rat retina, suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet to malnutrition induced during brain development. **Brain research bulletin**, v. 64, n. 5, p. 395–408, 15 jan. 2005.

VITURI, C. L. *et al.* Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 33, n. 8, p. 889–95, ago. 2000.

WAINWRIGHT, P. E. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, n. 01, p. 61–69, 28 fev. 2007.

WANG, D. D.; BORDEY, A. The astrocyte odyssey. **Progress in neurobiology**, v. 86, n. 4, p. 342–67, 11 dez. 2008.

WANG, D.; FAWCETT, J. The perineuronal net and the control of CNS plasticity. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 1, p. 147–60, jul. 2012.

WHITE, C. J. B.; A, J. A. PPLEB. The influence of pre- and perinatal malnutrition on sulphated glycosaminoglycans in rat brain. **Reserch in Experimental Medicine**¹, v. 174, n. 2, p. 153–158, 1979.

WIESE, S.; KARUS, M.; FAISSNER, A. Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. **Frontiers in pharmacology**, v. 3, n. June, p. 120, jan. 2012.

XAVIER, J. G. *et al.* Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. **Histology and histopathology**, v. 22, n. 6, p. 651–60, jun. 2007.

ZHAO, N. *et al.* Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. **Neurobiology of disease**, v. 29, n. 2, p. 176–85, fev. 2008.

APÊNDICE 1

Capítulo de Livro Microglia – Rede Glial

RESTRIÇÃO DIETÉTICA EM ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 INDUZ REATIVIDADE FENOTÍPICA NA MICROGLIA DA SUBSTANTIA NIGRA DE RATOS

TITLE: Nutritional restriction of omega-3 fatty acids induces phenotypic plasticity in the microglia of rat *substantia nigra*

Autores: ¹Isaac, A.R. ¹Gonçalves-Pimentel, C. ¹Silva, E.A.N. ¹Santos-Junior, E.F. ¹Moreno, G.M.M. ¹Seabra, M.A. ¹Santos, R.V.C. ¹Augusto, R.L. ²Guedes, R.C.A. e ¹Andrade-da-Costa, B.L.S.*

1. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.
2. Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco

*belmira@gmail.com ou bl@ufpe.br

The authors contributed equally to this paper.

Resumo

Deficiência crônica em ácido docosahexaenóico (DHA) induz neurodegeneração no sistema nigro-estriatal de ratos. Para investigar se atividade microglial contribui para este efeito, o presente estudo analisou alterações fenotípicas indicativas de seu estado reativo na *substantia nigra*. Ratos foram mantidos a partir da concepção em dietas contendo níveis adequados ou deficientes em ácido alfa-linolenico e analisados na idade adulta. Os resultados evidenciaram alterações morfológicas e marcação para a lectina obtida do *Lycopersicum esculentum* na microglia do grupo deficiente em DHA em comparação ao controle. Os achados sugerem que reatividade microglial pode contribuir para a neurodegeneração induzida pela deficiência em DHA na *substantia nigra*.

Abstract

Chronic docosahexanoic acid (DHA) deficiency induces neurodegeneration in the rat nigrostriatal system. To investigate whether microglia activity in the *substantia nigra* contributes to this effect, this study analyzed phenotypic changes indicative of their reactive state. Rats were raised from conception in diets containing adequate or deficient levels of alfa-linolenic acid and analyzed in adulthood. The results showed morphological changes and labeling with lectin obtained from *Lycopersicum esculentum* in the microglia of deficient group in comparison to the control. The findings suggest that microglial reactivity can contribute to *substantia nigra* neurodegeneration induced by DHA deficiency.

Introdução

O ácido graxo polinsaturado docosahexaenoico (DHA) da família ômega-3 e seus metabólitos desempenham funções essenciais durante o desenvolvimento do sistema nervoso (Innis, 2007). Além de constituinte estrutural das membranas, atua como sinalizador de eventos moleculares capazes de modular mecanismos epigenéticos (Goustard-Langelier *et al.*, 2013), interações intra e inter-celulares e a transcrição gênica (Yavin, 2006). Níveis balanceados de DHA e do ácido araquidônico (AA) da família ômega-6, são necessários ao adequado metabolismo cerebral, em parte pelas ações opostas que estes podem exercer sobre mecanismos inflamatórios (Schimidtz *et al.*, 2008) envolvidos em algumas doenças degenerativas (Bousquet *et al.*, 2011). Na doença de Parkinson, por exemplo, a neurodegeneração da substantia nigra (SN) tem sido associada, dentre outros fatores, ao estado inflamatório decorrente da reatividade microglial (Croisier *et al.*, 2005;

Sanchez-Guajardo *et al.*, 2013). Neste contexto a suplementação dietética do DHA tem sido indicada como uma alternativa nutracêutica por aumentar a síntese de eicosanóides anti-inflamatórios (Calder, 2012) e por exercer ações inibitórias sobre a expressão de fatores de transcrição gênica envolvidos na síntese de citocinas pro-inflamatórias (Ji *et al.*, 2012).

Evidências recentes indicam que desequilíbrio nos níveis de ômega-3 e 6 na dieta materna induzem reatividade microglial no estriado (Kuperstein *et al.*, 2008; razão $\omega 6/\omega 3=173$) e alteram fenótipo e motilidade da microglia no hipocampo, durante o aleitamento (Madore *et al.*, 2014; razão $\omega 6/\omega 3=280$). Tais resultados, no entanto, não refletem apenas o efeito de uma deficiência de DHA uma vez que níveis de AA foram aumentados. Utilizando um modelo de restrição dietética crônica em ácidos graxos essenciais, capaz de induzir depleção de DHA (~65%) sem afetar o AA encefálico, evidenciamos neurodegeneração na *substantia nigra* (SN) associada a elevados níveis de óxido nítrico e lipoperoxidação, além de redução na expressão de BDNF em animais adultos (Cardoso *et al.*, 2012, 2013).

Neste estudo, considerando as evidências de modulação do DHA na sinalização neuroinflamatória, hipotetizamos que a deficiência em DHA per se, na ausência de elevados níveis de AA induz reatividade fenotípica na microglia da SN como um dos mecanismos envolvidos na neurodegeneração observada neste núcleo (Cardoso *et al.*, 2013).

Métodos utilizados

Ratos Wistar foram subdivididos em dois grupos de acordo com as dietas, as quais diferiram quanto à composição adequada (controle) ou reduzida (deficiente) em ácidos linoleico e alfa-linolênico (Cardoso *et al.*, 2013). Tal dieta foi mantida por duas gerações e os encéfalos de animais machos (90-100 dias) da segunda geração foram analisados. Após perfusão transcardíaca dos animais, secções parassagitais (45 μ m) dos encéfalos foram obtidas em criostato (Leica). Para visualização da microglia foram utilizados o anticorpo monoclonal anti-IBA-1 feito em coelho (Wako Chemical) e a lectina do tomate *Lycopersicum esculentum* (Sigma-Aldrich) sendo a imunomarcção obtida pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Labs) e o cromógeno diaminobenzidina. Análise do fenótipo morfológico da microglia foi realizada nos limites citoarquitetônicos de 3 secções parassagitais ao nível medial da SN de 3 animais por grupo. Imagens digitalizadas foram obtidas (microscópio Nikon DS-Fi1; objetiva 100x/1.25) e o programa Image J, 1.45s, NIH, USA utilizado para análise morfolométrica.

Resultados

O painel apresentado na figura 1 ilustra imagens de regiões da SN de 2 animais representativos dos grupos controle ou deficiente em ômega-3. Em ambos os grupos as células da microglia imunorreativas à proteína IBA-1, encontram-se uniformemente distribuídas ao longo deste núcleo. Porém, é possível detectar que no grupo deficiente várias células da microglia apresentam uma imunorreatividade mais intensa caracterizada pelo espessamento do corpo celular e prolongamentos, (Fig 1C e 1D) quando comparadas às observadas no grupo controle (Fig 1A e 1B). Análise quantitativa de parâmetros morfométricos realizada ao nível medial da SN evidenciou um aumento significativo ($p < 0.0001$; Mann Whitney test) na área do soma (mediana $62.12 \mu\text{m}^2$; $\text{min}=24.16$; $\text{max}=125.33$) e na forma elipsoidal dada pela diferença entre o diâmetro máximo e mínimo (mediana $5.281 \mu\text{m}$; $\text{min}=1.03$; $\text{Max}=8.51$) da microglia do grupo deficiente ($n=318$) comparado ao grupo controle (medianas $44.27 \mu\text{m}^2$ [$17.63\text{-}86.50 \mu\text{m}^2$] e $3.92 \mu\text{m}$ [$1.06\text{-}8.70 \mu\text{m}$] $n=300$).

Além das alterações morfológicas observadas nas células do grupo deficiente foi também detectada imunomarcagem para a lectina do tomate *Lycopersicum esculentum*, que detecta microglia em diferentes estágios de reatividade e neuroinflamação (Pelaez *et al.*, 1999; Borner *et al.*, 2011). As figuras 1E e 1F ilustram respectivamente, imagens representativas da SN de animais dos dois grupos, evidenciando marcação da lectina em vasos, no grupo controle e em vasos e células da microglia no grupo deficiente em DHA.

Discussão e Conclusões gerais

Modificações na forma e dimensão do corpo celular da microglia têm sido correlacionadas com os diferentes estágios de atividade que a mesma apresenta em condições de neuroinflamação (Torres-Platas *et al.*, 2014). Neste estudo evidenciamos que uma deficiência específica em DHA, sem elevação dos níveis de AA, é capaz de promover alterações fenotípicas na microglia da SN indicativas de um estado reativo. Os resultados reforçam a ideia de um efeito modulatório do DHA sobre a função da microglia (Ji *et al.*, 2012; Pettit *et al.*, 2013) e enfatizam a importância do aporte adequado deste ácido graxo para minimizar condições neurodegenerativas.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio financeiro fornecido pelo CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Procad no. 131/2007 e PROCAD NF-2009), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE (APQ 0036-2.07/11), Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INCT no. 573604/2008-8).

Referências

Borner R. Bento-Torres J. Souza D.R. Sadala, D.B. Trevia, N. Farias, J.A. Lins, N. Passos, A. Quintairos, A. Diniz, J.A. Perry, V.H. Vasconcelos, P.F. Cunningham, C. and Picanço-Diniz, C.W. Early behavioral changes and quantitative analysis of neuropathological features in murine prion disease: stereological analysis in the albino Swiss mice model (2011).

Prion. 5: 215-227

Bousquet, M. Calon, F. and Cicchetti, F. (2011) Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. *Ageing Research Reviews* 10: 453–463.

Calder, P.C. (2012) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *British Journal of Clinical Pharmacology* 75: 645-662.

Cardoso, H.D. Passos, P.P. Lagranha, C.J. Ferraz, A.C. Santos-Júnior, E.F. Oliveira, R.S. Oliveira, P.E. Santos, R. C. Santana, D.F. Borba, J.M. Rocha-de-Melo, A.P. Guedes, R.C.A. Navarro, D.M. Santos, G.K. Borner, R. Picanço-Diniz, C.W., Beltrão, E.I. Silva, J.F. Rodrigues, M.C. Andrade da Costa, B.L.S. (2012). Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids. *Front Hum Neurosci*. 6:249.

Cardoso, H.D. Santos-Junior, E.F. Santana, D.F. Gonçalves-Pimentel C. Angelim, M.K. Isaac, A.R. Lagranha, C.J. Guedes, R.C.A. Beltrão, E.I. Morya, E. Rodrigues, M.C. Andrade-da-Costa, B.L. S. (2014). Omega-3 deficiency and neurodegeneration in the substantia nigra: involvement of increased nitric oxide production and reduced BDNF expression.

Biochim Biophys Acta. 1840:1902-1912. Epub 2013 Dec 20.

- Croisier, E. Moran, L.B. Dexter, D.T. Pearce, R.K. Graeber, M.B. (2005). Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. *J Neuroinflammation*. **2**:14
- Goustard-Langelier, B. Koch, M. Lavialle, M. Heberden, C. (2013) Rat neural stem cell proliferation and differentiation are durably altered by the in utero polyunsaturated fatty acid supply. *Journal of Nutritional Biochemistry* **24**: 380–387.
- Innis, S.M. (2007). Fatty acids and early human development. *Early Human Development* **83**: 761–766,
- Ji, A. Diao, H. Wang, X. Yang, R. Zhang, J. Luo, W. Cao, R. Cao, Z. Wang, F. Cai, T. (2012) N-3 polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation and dopaminergic injury in rats. *NeuroToxicology* **33**: 780–788.
- Kuperstein, F. Eilam, R. Yavin, E. (2008). Altered expression of key dopaminergic regulatory proteins in the postnatal brain following perinatal n-3 fatty acid dietary deficiency. *Journal of Neurochemistry* **106**: 662–671.
- Madore, C. Nadjar, A. Delpech, J.C. Sere, A. Aubert, A. Portal, C. Joffre, C. Layé, S. (2014). Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. *Brain Behav Immun*. Apr 13. pii: S0889-1591(14)00087-7.
- Peláez, B. Blázquez, J.L. Pastor, F.E. Sánchez, A, Amat, P. (1999).Lectin histochemistry and ultrastructure of microglial response to monosodium glutamate-mediated neurotoxicity in the arcuate nucleus. *Histol Histopathol*. **14**:165-174.
- Pettit, L.K. Varsanyi, C. Tadros, J. Vassiliou, E. (2013). Modulating the inflammatory properties of activated microglia with Docosahexaenoic acid and Aspirin. *Lipids Health Dis*. **12**:16
- Sanchez-Guajardo, V. Barnum, C.J. Tansey, M.G. Romero-Ramos, M. (2013). Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to α -synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity. *ASN Neuro*. **5**:113-139.

Schmitz, G. Ecker, J. (2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research* **47**: 147–155.

Torres-Platas, S.G. Comeau, S. Rachalski, A. Bo, G.D. Cruceanu, C. Turecki, G. Giros, B. Mechawar, N. (2014) Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation*. **11**:12

Yavin E. (2006) Versatile roles of docosahexaenoic acid in the prenatal brain: from pro- and anti-oxidant features to regulation of gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **75**: 203-211.

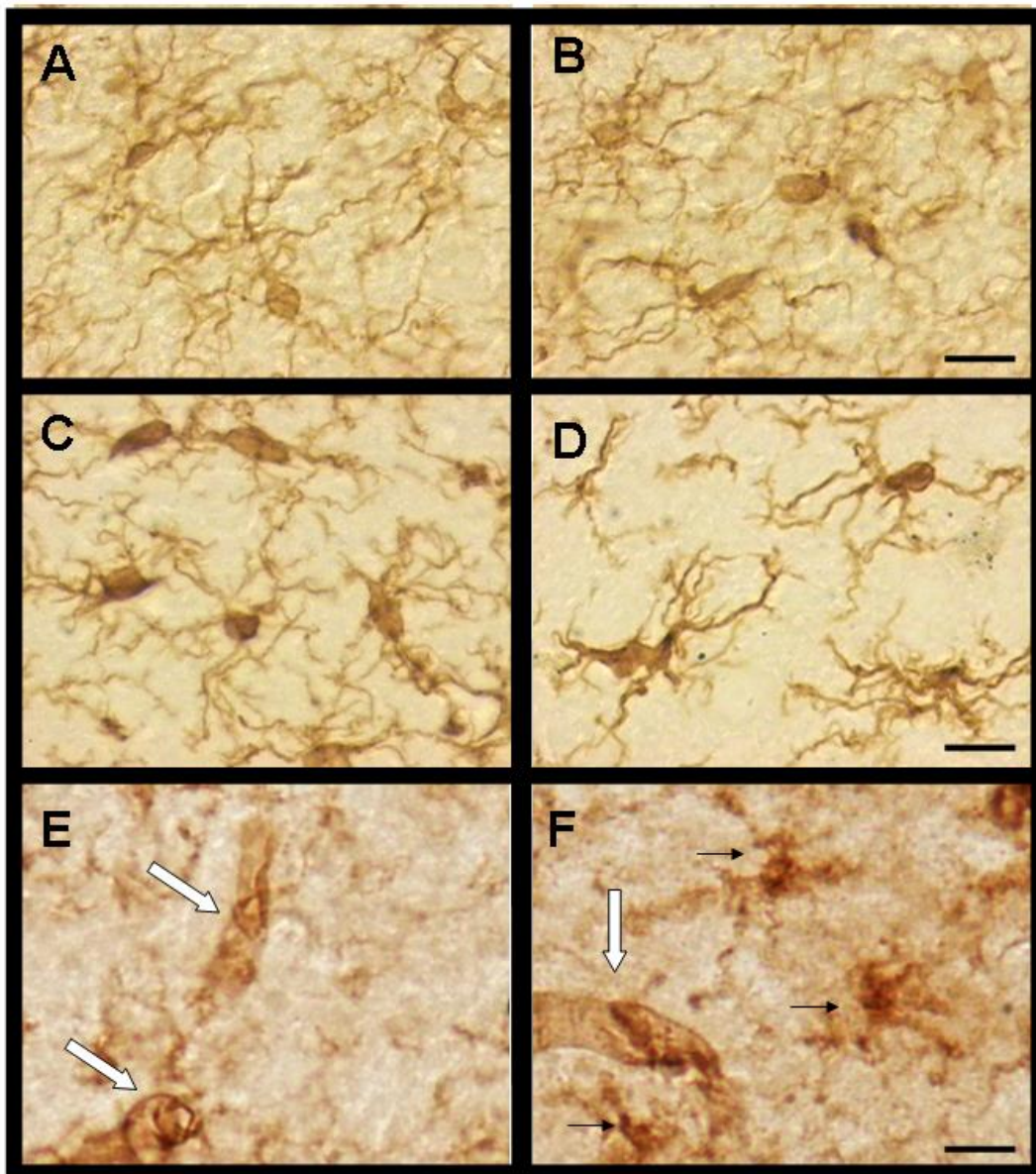


Figura 1: Alterações fenotípicas induzidas pela deficiência em DHA na microglia da substantia nigra, evidenciada pela imunorreatividade à proteína IBA-1(A e B no grupo controle) (C e D no grupo deficiente) e à lectina do tomate *Lycopersicum esculentum* (E, controle e F, deficiente). Observar alterações na dimensão e forma do corpo e prolongamentos celulares. Setas brancas em E e F indicam marcação de vasos e setas pretas marcação de microglia reativa. Escala = 10 μ m.

APÊNDICE 2

IN VIVO AND IN VITRO STUDIES OF THIOL - CAPPED CdTe AQUEOUS COLLOIDAL QUANTUM DOTS AS A TOOL FOR BRAIN TUMOR DIAGNOSTICS

Seabra, Maria A.B.L.¹, Dubois, L. G.², Santos-Júnior, E.F.³, Cavalcanti-Santos, R. V.³, Isaac, A.R.³, Fontes, A.⁴, Hochhaus, G.⁵, Andrade-da Costa, B.L.S.³, Moura Neto, V.², and Santos, B.S.^{1*}

¹Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE – Brasil CEP: 50670-901

²Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Anatomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, bloco F - Cidade Universitária - Rio de Janeiro, RJ – Brasil CEP: 21941-590

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901

⁴Departamento de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901

⁵Pharmaceutics Department, University of Florida, J. Hillis Miller Health Center, Room P3-20, 1600 SW Archer Rd. – Gainesville – FL – USA 32610-0494

* Corresponding author. Email: beate_santos@yahoo.com.br

Abstract

Glioblastoma (grade IV) is the most aggressive and infiltrating tumor of the central nervous system, showing a variety of mutations as well as high degree of vascularity, cell polymorphism and nuclear atypia. Unfortunately quick diagnose and full resection of brain tumors during neurosurgery are difficult and new alternatives are being investigated specially those involving fluorescent nanoparticles. In the present work, it was hypothesized that aqueous colloidal cadmium telluride (CdTe) quantum dots conjugated to anti-glial fibrillar acidic protein (GFAP) are suitable to be used as a new *in vivo* targeting and imaging method when injected for a short period into U87 glioblastoma tumor type xenotransplanted into male swiss mice brain. We have synthesized and optimized anti-GFAP conjugated red-emitting CdTe QDs to label also U87 tumor cell line *in vitro* and tested their ability to be incorporated in healthy cerebral cortex astrocyte primary cultures. CdTe QDs viability was evaluated using MTT assay applied to U87 cells. The tumor growth into the brain parenchyma was visualized by the hematoxylin and eosin staining using brain tissue sections and the uptake of CdTe QDs conjugated to anti-GFAP by the U87 human tumor cell line was visualized by fluorescence microscopy. The results showed aqueous colloidal CdTe QDs were easily taken up by primary astrocytes as well as U87 cells *in vitro*. The viability of U87 cells treated with washed CdTe QDs for 1h was only 20% lower compared to control condition. Double-labeling for Vimentin and GFAP-conjugated CdTe QDs showed the ability of these nanoparticles to efficiently label the U87 tumor *in vivo 20 min after its injection*. Results reported here provide new perspectives for using aqueous colloidal CdTe QDs for a quick glioblastoma detection in animal model, suggesting a future potential application in imaging-guided surgery.

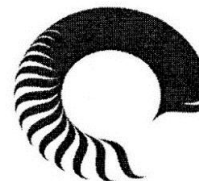
Keywords

Quantum Dots, U87 cell line, Glioblastoma, Xenograft model, Fluorescence microscopy

ANEXO 1

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 02 de maio de 2013.

Ofício nº 564/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Profª Belmira Lara da Silveira Andrade Costa**

Universidade Federal de Pernambuco

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Processo nº 23076.056375/2012-98

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Pode a Má-nutrição Severa Multifatorial Comprometer a Composição da Matriz Extracelular do Córtex Cerebral de Ratos Neonatos?”**.

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

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia/UFPE. Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: progenitores e neonatos de 0 a 3 dias; Peso: 250-300g(adultos) e aproximadamente 7g (neonatos); sexo: machos e fêmeas; nº total de animais: 178 ratos.

Atenciosamente,



Profa. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA