

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

***Efeitos da desnutrição protéica pós-natal no desempenho de ratos em diferentes tarefas de aprendizagem e memória.***

**Camila Tavares Valadares**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Psicobiologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

***Efeitos da desnutrição protéica pós-natal no desempenho de  
ratos em diferentes tarefas de aprendizagem e memória.***

**Camila Tavares Valadares**

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida

Tese de Doutorado apresentada à  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras  
de Ribeirão Preto da USP, para obtenção  
do título de Doutor em Ciências, Área:  
Psicobiologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2006

*“A fé é o fundamento da esperança,  
é uma certeza à respeito do que não se vê.”  
(Hebreus 11:1)*

*Dedicatórias*

---

***Aos meus amados pais, Ademar e Elza***

*Meu eterno amor e agradecimento.*

*Pelo que hoje me tornei, graças à confiança que colocaram em mim.*

*Por acreditarem naquilo que eu poderia me transformar, mesmo que outras pessoas dissessem o contrário.*

*Pelo amor incondicional. Pela paciência e pelo apoio em todas as horas.*

*Eu agradeço muito a Deus por tê-los como pais e principalmente pela graça que nos foi concedida recentemente.*

***AMO MUITO VOCÊS!***

***Ao meu inigualável marido, Carlos***

*Por todo o carinho e atenção necessários para que pudesse concretizar este trabalho.*

*Pela compreensão nas horas difíceis e, às vezes, com as minhas ausências.*

*Por me apoiar e muitas vezes me fazer acreditar que todo o sacrifício seria recompensado.*

*Pelo amor e companheirismo... MUITO OBRIGADA!*

*Sem você, nem eu e nem este trabalho estaríamos completos.*

***TE AMO MUITO!***

*A vocês, dedico este trabalho.*

*Agradecimientos*

---

Em primeiro lugar, quero agradecer a **Deus** e ao **Nosso Senhor Jesus Cristo**, por todas as graças que tenho recebido.

Ao **Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida**, mais do que meu orientador, um amigo, pela paciência e dedicação durante toda a orientação deste trabalho e principalmente pelo apoio e compreensão. Meu eterno respeito e gratidão.

A **Profa. Dra. Telma Maria Braga Costa**, assessora do presente trabalho, por todas as sugestões e revisões que foram de suma importância para o desenvolvimento dessa tese.

Ao **Prof. Dr. Luiz Marcelino de Oliveira** e à **Profa. Dra. Rita de Cássia Margarido Moreira**, pelas valiosas contribuições durante o exame de qualificação, que muito ajudaram para a melhoria do trabalho.

As amigas de laboratório **Ana Laura, Andréa, Idalina, Marisa e Paula Carol**, por toda ajuda e amizade. Pelas conversas que tanto aliviaram nas horas de desânimo. Sem esquecer da amiga **Luciana (mineirinha)**, que mesmo não estando mais em nosso laboratório continuou sendo nossa companheira.

A querida **Renata Beatriz Vicentini**, que mais do que a secretária foi uma amiga, por toda a ajuda tanto profissional quanto pessoalmente.

Ao **Dalmo**, por sua disposição em sempre ajudar.

A todos os membros da banca, que aceitaram participar desse processo.

A todos os **amigos**, da "**Psicobio**" e aos de fora também, que ajudaram direta e indiretamente para que este trabalho fosse finalizado.

Aos amigos do **Centro Universitário Claretiano**, por me ouvirem falar todos os dias dessa tese e não se irritarem comigo.

Aos meus **alunos**, que me serviram de estímulo para concluir este trabalho.

A **capes**, pelo apoio financeiro.

**MUITO OBRIGADA A TODOS!**

## *Sumário*

---

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	i
<b>LISTA DE TABELAS</b>	iii
<b>RESUMO</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODO</b>	24
Animais .....	24
Composição das Ninhadas .....	24
Manutenção das Ninhadas .....	24
Manutenção dos animais pós-desmame .....	25
Composição e Preparo das Dietas .....	25
Experimento I .....	29
Equipamento .....	29
Procedimento .....	32
Experimento II .....	33
Equipamento .....	33
Procedimento .....	34
Experimento III .....	35
Equipamento .....	35
Procedimento .....	36
Análise estatística .....	38

<b>4. RESULTADOS</b>	39
Peso Corporal .....	39
Medidas Comportamentais do Experimento I .....	42
Medidas Comportamentais do Experimento II .....	47
Medidas Comportamentais do Experimento III .....	48
<b>5. DISCUSSÃO</b>	50
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	65
<b>8. ANEXOS</b> .....	73

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> –Desenhos esquemáticos dos aparatos utilizados nos testes de memória espacial, como Labirinto Radial de 8 braços (A), Labirinto Aquático de Morris (B) e Labirinto em T (C). .....	15
<b>Figura 2</b> - Divisão do Labirinto Aquático nos 4 quadrantes imaginários. A plataforma mudava de quadrante a cada dia. ....	30
<b>Figura 3</b> - Esquema do equipamento utilizado. ....	31
<b>Figura 4</b> - Esquema do equipamento utilizado .....	34
<b>Figura 5</b> – Peso corporal das ratas-mães (Média ± EPM) controle (n=22) e desnutridas (n=22) durante o período de lactação. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ....	40
<b>Figura 6</b> – Peso corporal das ninhadas (Média ± EPM) do grupo controle (n=22) e do desnutrido (n=22) durante o período de lactação. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ....	40
<b>Figura 7</b> –Peso corporal dos filhotes (Média ± EPM) durante o período de pós-lactação até a fase adulta (70 dias). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ....	41
<b>Figura 8</b> –Peso corporal dos filhotes (Média ± EPM) durante o período de pós-lactação até a fase adulta (70 dias) e na segunda fase do experimento I (250 dias de idade). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ....	42
<b>Figura 9</b> – Latência de fuga (Média ± EPM) dos animais dos grupos controle (n = 14) e desnutridos (n = 13) durante as 24 tentativas, na fase 1 (70 dias de idade). ....	45
<b>Figura 10</b> –Porcentagem de tempo despendido pelos animais dos grupos controle (n= 14) e desnutrido (n=13) nos quatro quadrantes do labirinto aquático de Morris durante a <i>probe trial</i> , na fase 1. * $p < 0,05$ comparado aos outros quadrantes. ....	45
<b>Figura 11</b> – Latência de fuga (Média ± EPM) dos animais dos grupos controle (n = 14) e desnutridos (n = 13) durante as 24 tentativas, na fase 2 (250 dias de idade). ....	46

- Figura 12** – Porcentagem de tempo despendido pelos animais dos grupos controle (n= 14) e desnutrido (n=13) nos quatro quadrantes do labirinto aquático de Morris durante a *probe trial*, na fase 2. \*  $p < 0,05$  comparado aos outros quadrantes. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle na 2ª fase e aos grupos controle e desnutridos na 1ª fase. .... 46
- Figura 13** - Índice de reconhecimento (Media  $\pm$  EPM) dos animais dos grupos controle (n = 12/11) e desnutrido (n = 12/11) submetidos aos intervalos inter-tentativas de 3 e de 24h. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. .... 47
- Figura 14** – Atividade locomotora e comportamento exploratório (*rearing*) dos grupos controle e desnutrido durante a 1ª e 2ª tentativas, nos intervalos de 3 e 24h. \*  $p < 0,05$  para grupo desnutrido com 24h de intervalo comparado ao grupo controle com mesmo intervalo e para os grupos controle e desnutrido com 3h de intervalo. .... 48
- Figura 15** – Número de tentativas (Media  $\pm$  EPM) realizadas pelos animais dos grupos controle (n = 12/11) e desnutridos (n = 12/10) para atingirem um nível estável de desempenho (80% de acertos em três dias consecutivos) no Labirinto em T aquático, com intervalos de 10 e 30s entre as tentativas forçada-escolha. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo submetido ao intervalo de 10s. .... 49

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Procedimento experimental referente ao tratamento nutricional durante as fases de lactação e Pós-lactação. ....	25
<b>Tabela 2:</b> Composição e proporção dos nutrientes (%) da dieta utilizada nas fases de lactação (0 a 21 dias) e pós-lactação (22 a 49 dias). ....	26
<b>Tabela 3</b> - Mistura Vitamínica. Composição Básica do suplemento vitamínico para animais de laboratório - AIN-93 (American Institute of Nutrition). ....	27
<b>Tabela 4</b> - Mistura Salina: Composição Básica do suplemento mineral para animais de laboratório - AIN – 93. ....	27
<b>Tabela 5</b> - Composição da Dieta Comercial NUVILAB – CR1 – Nuvital Ltda. ....	28
<b>Tabela 6</b> – Posições da plataforma e as posições de partida para cada sessão. ....	29
<b>Tabela 7</b> - Seqüências de tentativas pariadas para testes no labirinto em T aquático. ....	37

*Resumo*

---

---

A desnutrição protéica em estágios iniciais da vida produz alterações estruturais, neuroquímicas e funcionais no sistema nervoso central, podendo causar prejuízos no desenvolvimento cognitivo e comportamental. Assim, o objetivo do presente estudo foi o de investigar os efeitos da desnutrição protéica pós-natal em tarefas que avaliam a aprendizagem e memória. Estas investigações foram feitas comparando o desempenho de ratos *Wistar*, submetidos à desnutrição protéica (6% de proteína) durante a lactação e pós-lactação com animais controle (16% de proteína), nas tarefas de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris (LAM), memória de reconhecimento de objetos no campo aberto e memória operacional no Labirinto em T Aquático (LTA). No experimento I a tarefa foi localizar uma plataforma oculta que mudou de posição a cada sessão diária com quatro tentativas no LAM. A memória a longo prazo foi avaliada após seis meses utilizando-se o mesmo procedimento. No experimento II os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento de objetos no campo aberto, em duas tentativas com diferentes intervalos intertentativas (3 e 24h). Na 1ª tentativa o animal foi habituado a um objeto A e na 2ª, discriminava o objeto A de um novo objeto B. No experimento III foi testado o desempenho dos animais no LTA, sendo inicialmente forçados a alternar os braços de entrada e, após esta fase, escolher em qual braço deveria entrar para encontrar a plataforma fixada em um dos braços. Os resultados mostraram déficits na aprendizagem e memória dos animais desnutridos no experimento I. Porém, na fase 2 a diferença entre os grupos nutricionais desapareceu. No experimento II, o índice de reconhecimento dos animais desnutridos foi significativamente maior que dos controle nos intervalos de 3 e 24h. No experimento III, houve diferença apenas do tipo de intervalo, sendo que no intervalo de 30s todos os animais demoraram mais para atingirem o critério proposto. Com estes resultados se pode concluir que a desnutrição protéica pós-natal causou prejuízos na memória operacional no LAM; porém, este déficit diminuiu seis meses depois, sugerindo que a recuperação nutricional foi eficiente para reverter as alterações causadas pela desnutrição. A tarefa de memória operacional no LTA não foi afetada por este modelo de desnutrição, independente do intervalo. Entretanto, a tarefa de memória de reconhecimento foi prejudicada pela desnutrição pós-natal, independente do intervalo, e a atividade exploratória somente no intervalo de 24h.

*Abstract*

---

Early protein malnutrition induces structural, neurochemical and functional changes in the Central Nervous System leading to alterations in cognitive and behavioral development of rats such as spatial learning and memory. The aim of this work was to investigate the effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory tasks. This evaluation was done by comparing the performance of previously malnourished male Wistar rats (6% protein) from birth to 49 days of age with well-nourished control animals (16% protein) in three experiments: working memory tasks in the Morris water maze (Experiment I) at 70 days of age (phase 1) and six months later (phase 2), recognition memory of objects in the open field (Experiment II) with two types of intervals (3 and 24) between the trials, and working memory in the water T-maze (Experiment III) with two types of intervals between trials (10 and 30 s). The results showed that the escape latency in malnourished animals in experiment I was significantly higher than escape latency in controls. On phase 2, this difference disappeared. In Experiment II, recognition indexes of malnourished groups were significantly higher in both 3-h and 24-h intervals. In Experiment III, there was a difference only in the type of interval, as the animals took longer to achieve the criteria in the 30-s interval. These results suggest that protein malnutrition caused impairments on the working memory in the Morris water maze, but these deficits disappeared after nutritional recovery. Recognition memory was impaired by postnatal malnutrition independently of the type of interval. Working memory in the water T-maze was not affected by postnatal protein malnutrition.

***Introdução***

---

## 1. INTRODUÇÃO

A desnutrição é um problema de saúde causada principalmente pela ingestão de alimentos em quantidades insuficientes para o desenvolvimento e funcionamento ótimo do organismo, podendo ocorrer também por falta ou insuficiência de nutrientes, por deficiências nos processos de transformação dos alimentos, na fase de absorção ou mesmo na utilização destes nutrientes pelo organismo. Sua origem é multifatorial e comumente está relacionada com baixo nível social e econômico, como também por outros fatores relacionados à produção, armazenamento, industrialização, distribuição e custo dos próprios alimentos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a desnutrição está entre os maiores perigos à saúde, juntamente com comportamento sexual de risco, hipertensão, tabagismo, alcoolismo, falta de saneamento básico e de água tratada, colesterol alto, fumaça procedente da queima de combustíveis sólidos, carência de ferro na alimentação e obesidade. Calcula-se ainda que a desnutrição causou cerca de 3,4 milhões de mortes em 2000, principalmente de crianças. A situação é ainda mais grave em países em desenvolvimento. A estimativa é de que 174 milhões de crianças menores de cinco anos têm desnutrição indicada pelo baixo peso para idade e 230 milhões pela baixa estatura para a idade. Reconhece-se que cerca de 55% das mortes infantis em países pobres, estão associadas à desnutrição (<http://www.aleitamento.org.br>). Em 2002, dos 57 milhões de óbitos, 10 milhões e meio correspondiam a crianças menores de cinco anos de idade, e as causas estão diretamente relacionadas à desnutrição (<http://www.who.int/>).

O Brasil, mesmo passando por importantes transformações econômicas nos últimos 20 anos, ainda é um país com um grande índice de pessoas abaixo do nível da pobreza. Segundo o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea), no Brasil, cerca de 23 milhões de pessoas (15% da população) sobrevive em condições de miséria, sem acesso à quantidade mínima de alimentos necessária para a manutenção de uma vida saudável, que é de algo em torno de 2000 calorias.

A maioria das pessoas associa a desnutrição às imagens de televisão feitas na África, onde uma legião de esqueléticos espera que órgãos internacionais enviem a próxima refeição. Esta condição é típica de um tipo de desnutrição chamado *Marasmo*, caracterizado pela perda de tecido muscular e adiposo, reduzindo cerca de 60% do peso corporal esperado pela idade (TRUSSWELL, 1981). No Brasil, esse tipo de desnutrição é muito difícil de ser encontrada.

Por aqui é mais comum a desnutrição do tipo *Kwashiorkor*, palavra importada da África, que significa “primeira criança-segunda criança” e vem da observação de que a primeira criança desenvolve *Kwashiorkor* quando a segunda criança nasce e a substitui no peito da mãe. Esse tipo de desnutrição é caracterizado pela perda de tecido muscular com preservação do tecido adiposo (WATERLOW, 1984). A doença atinge crianças que, privadas de sais minerais e vitaminas e principalmente da proteína encontrada no leite materno, em um primeiro momento, e mais tarde de carne, alimentam-se basicamente de carboidratos. O quadro inclui diarreia, anemia e retardamento motor. Quando não tratada a doença evolui, a imunidade do paciente cai e o corpo incha, dando a aparência de uma criança “gordinha”. Em casos mais graves, pode ocorrer má formação do sistema neurológico levando às dificuldades no aprendizado e, ainda, morte. Mesmo se tratada, essa

criança dificilmente atingirá altura e peso normais, devido à adaptação do metabolismo às deficiências alimentares durante o desenvolvimento do organismo.

A desnutrição pode ser diagnosticada através de uma análise dos sinais e sintomas clínicos sob os indicadores antropométricos (peso/idade, altura/idade e peso/altura), bioquímicos e/ou funcionais dos estados nutricionais, bem como pela dificuldade no acesso ao alimento relacionado ao nível sócio-econômico (SCHÜRCH, 1995).

O estado nutricional é uma condição importante no desenvolvimento e organização funcional do Sistema Nervoso Central (SNC), estando diretamente relacionado com a produção de energia e de nutrientes necessários ao desenvolvimento de estruturas celulares e dos vários sistemas metabólicos (MORGANE *et al.*, 1992). O processo de maturação do SNC e o bom desenvolvimento da capacidade mental dependem de três fatores: genética do indivíduo, estimulação ambiental e nutrientes disponíveis (GALLER *et al.*, 1995).

Com relação aos efeitos da desnutrição sobre o organismo devem ser considerados alguns fatores como, o tipo, a gravidade (grau da desnutrição), a fase em que a desnutrição ocorreu (pré ou pós-natal) e a duração do insulto nutricional, assim como a interação destes fatores com fatores genéticos e ambientais (MORGANE *et al.*, 1992).

O tipo de desnutrição está relacionado à natureza da deficiência do nutriente, ou seja, se é uma deficiência protéica, calórica, vitamínica, de minerais, ou ainda combinação deles.

Dentre os vários tipos de desnutrição encontrados na literatura a desnutrição protéica vem se destacando pelo fato de a proteína ser um dos nutrientes mais importantes, por possuir aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas estruturais, enzima, neuropeptídeos e neurotransmissores (GALLER *et al.*, 1995). Devido a esses fatores, os

efeitos da desnutrição protéica vêm sendo muito estudados nas últimas décadas (ANDRADE *et al.* 1995a; ANDRADE *et al.* 1995b; ANDRADE *et al.*, 1996; ANDRADE; PAULA-BARBOSA, 1996; AUSTIN LA-FRANCE, 1991; DIAZ-CINTRA *et al.*, 1991; LUKOYANOV; ANDRADE, 2000; FUKUDA *et al.*, 2002; VALADARES; ALMEIDA, 2005, DA SILVA HERNANDES *et al.*, 2005).

As proteínas são macromoléculas constituídas de cadeias polipeptídicas muito longas, tendo de 100 a mais de 2000 resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Todos os aminoácidos possuem, em uma das extremidades, um radical amino e na outra um radical carboxílico, e para formar a proteína o radical amino de um aminoácido liga-se ao radical carboxílico do outro, estabelecendo uma ligação peptídica entre eles. Todas as proteínas são feitas do mesmo conjunto de 20 aminoácidos e as suas diferentes funções resultam das diferenças na composição e seqüenciamento de seus aminoácidos. De acordo com suas funções, as proteínas podem ser classificadas em enzimas, proteínas transportadoras, proteínas estruturais, proteínas contráteis, proteínas nutrientes e de armazenamento, proteínas de defesa, proteínas reguladoras, entre outras (LEHNINGER, 1995).

Todos os tecidos utilizam os aminoácidos disponíveis para a síntese de proteínas celulares específicas, necessárias à formação ou reparo e manutenção das já existentes. Alguns desses aminoácidos são provenientes da degradação das proteínas fornecidas pelo alimento, enquanto outros podem ser sintetizados pelo organismo, conforme a necessidade. Na alimentação devem ser fornecidos aminoácidos descritos como essenciais. Os aminoácidos não essenciais podem ser fornecidos pelo alimento ou podem ser sintetizados pelo próprio organismo a partir de precursores disponíveis. Se um ou mais dos aminoácidos

essenciais não estiver presente em quantidade suficiente quando uma proteína está sendo sintetizada, esta síntese será quantitativamente limitada pela indisponibilidade do aminoácido (BURTON, 1979).

A fase em que a desnutrição ocorreu também é um fator importante na determinação dos efeitos que esta terá sobre o encéfalo e comportamento. Dobbing (1968) relatou que existem períodos especificamente “críticos”, no início da vida, onde o organismo parece estar particularmente vulnerável aos efeitos da desnutrição. Esses “períodos críticos” são definidos como o período em que o cérebro está aumentando o seu peso de maneira particularmente rápida, acompanhado dos processos de desenvolvimento neuroquímicos e neuroanatômicos (“*brain growth spurt*”). Segundo Morgane *et al.* (1993), atualmente, o período crítico refere-se ao pico da atividade de eventos específicos da neurogênese, gliogênese, migração celular e diferenciação celular.

Em humanos, a fase de maior vulnerabilidade do cérebro à desnutrição é durante o período que vai do terceiro mês de gestação até o segundo ano de vida (DOBBING, 1968). Em outras espécies animais, como os roedores, este período ocorre nas três primeiras semanas após o nascimento (MORGANE *et al.*, 1993). Sendo assim, as estruturas que se desenvolvem após o nascimento destes animais, como a formação hipocampal, o bulbo olfatório e o cerebelo são as mais vulneráveis à desnutrição pós-natal. Se o insulto nutricional ocorrer durante períodos críticos do desenvolvimento do SNC podem ser produzidos efeitos permanentes em suas funções, particularmente no desenvolvimento cognitivo.

Assim, a desnutrição protéica durante os estágios iniciais da vida causa danos no desenvolvimento cerebral, alterando os parâmetros neuroanatômicos, neuroquímicos,

neurofisiológicos e/ou funcionais (GALLER *et al.*, 1995; STRUPP; LEVITSKY, 1995). Se o insulto nutricional for revertido, muitas destas alterações também podem ser revertidas, embora algumas pareçam ter caráter permanente.

Um dos efeitos estruturais mais marcantes da desnutrição precoce é a redução tanto do peso corporal como do cerebral (DOBBING, 1987), sendo que esses efeitos permanecem mesmo após a recuperação nutricional. Outras análises demonstraram diminuição do nível total de ácido desoxirribonucleico (DNA) na formação hipocampal (LEWIS *et al.*, 1979; LUKOYANOV; ANDRADE, 2000), além da redução da quantidade de mielina (MORGANE *et al.*, 1992) e lipídeos (DOBBING, 1968). Tem-se demonstrado também que a desnutrição afeta a fase de divisão celular, com prolongamento do tempo do ciclo celular (MORGANE *et al.*, 1993). Em um estudo autoradiográfico das células granulares da fâscia denteada (giro denteado do hipocampo), Lewis *et al.* (1979) notaram que o tempo total do ciclo celular (fases G1, S e G2) era maior em ratos desnutridos nos períodos pré ou pós-natal.

Uma das estruturas encefálicas particularmente alterada pela desnutrição é a formação hipocampal, principalmente quando o insulto ocorre no período pós-natal. A neurogênese destas estruturas, em ratos e em humanos, continua seu desenvolvimento no período pós-natal e tem um de seus picos durante este período (MORGANE *et al.*, 1992).

A formação hipocampal é constituída por três partes: o giro denteado, o hipocampo propriamente dito e o subículo. Em humanos, o hipocampo e o giro denteado situam-se profundamente no lobo temporal, paralelos ao giro para-hipocampal. O subículo é uma zona de transição entre o hipocampo e a área entorrinal, parte do giro para-hipocampal (YOUNG; YOUNG, 1998).

O giro denteado é formado de três camadas distintas: a camada molecular (externa), a camada granular (média) e a camada polimórfica (profunda). O tipo de neurônio mais característico e abundante é a *célula granular*, cujos corpos celulares estão densamente empilhados na camada granular. Sua árvore dendrítica irradia-se para a camada molecular e seus axônios saem do giro denteado e chegam à camada molecular do hipocampo como *fibras musgosas* (BURT, 1995).

O hipocampo, paralelo ao giro denteado em localização e desenvolvimento, também é formado por três camadas: a camada polimórfica (externa), a camada de células piramidais (média) e camada molecular (profunda). O tipo celular mais característico do hipocampo é a célula piramidal da camada de células piramidais, cujas árvores dendríticas se estendem até a camada molecular. Seus dendrito e axônios descem até a camada polimórfica (BURT, 1995).

Embora o hipocampo seja uma estrutura relativamente uniforme quanto à estrutura, há algumas pequenas diferenças entre regiões e áreas, tanto em padrões citoarquitetônicos quanto neuroquímicos. Devido a estas diferenças, o hipocampo é subdividido em regiões e campos (CA1, CA2, CA3 e CA4). A região superior contém uma camada compacta de células piramidais e estende-se até aproximadamente a metade da distância do subículo ao giro denteado. O restante do hipocampo é a região inferior. O hipocampo é dividido em quatro campos, designados pelas letras CA (*cornu ammonis*), e um número, de um a quatro. O CA1 ocupa a maior parte da região superior, CA3, a maior parte da região inferior. O CA2 é uma pequena zona de transição entre CA1 e CA3. CA4 fica na zona de transição entre o hipocampo e o giro denteado (BURT, 1995).

A formação hipocampal é uma estrutura que desempenha um importante papel na aprendizagem e memória. Vários estudos têm indicado que os prejuízos na aprendizagem e memória espacial estão correlacionados com alterações fisiológicas e/ou neuroanatômicas desta estrutura, principalmente dos campos CA3 e CA4, como também, as alterações nas células granulares do giro denteado em animais que foram desnutridos na fase pré e pós-natal (MORGANE *et al.*, 1993).

Lukoyanov e Andrade (2000) demonstraram que a privação de proteína produziu em ratos adultos um considerável prejuízo dos comportamentos que dependem da integridade do hipocampo, como aprendizagem e memória espacial.

Ratos que passaram por um procedimento experimental de desnutrição protéica também apresentaram alterações degenerativas na arborização hipocampal (ANDRADE *et al.*, 1996), perda do contato sináptico (ANDRADE *et al.*, 1995a), mudanças no sistema colinérgico e GABAérgico e também uma importante diminuição na rede de fibras colinérgicas hipocampais após 12 meses de privação de proteína (ANDRADE; PAULA-BARBOSA, 1996).

Andrade *et al.* (1995b) demonstraram que a desnutrição, mesmo na fase adulta, causa uma grande redução na camada celular granular, no volume das células piramidais CA3 e CA1, na densidade numérica de células granulares e no número total de células granulares e piramidais na formação hipocampal. A comparação dos animais desnutridos e recuperados com animais controle bem nutridos revelou que tais alterações não foram revertidas com a recuperação nutricional. Porém, esta redução no número total de sinapses das fibras musgosas - CA3 pode ser revertida com a recuperação nutricional observada pela

semelhança entre os animais recuperados e controle. Os autores relatam que a recuperação nutricional produz uma reorganização no sistema das fibras musgosas.

A maioria dos estudos sobre os efeitos da desnutrição sobre a neurogênese na formação hipocampal está na fase pré-natal. Estes estudos demonstram que a desnutrição ocorrendo na fase embrionária altera a neurogênese pós-natal das células granulares (DEBASSIO *et al.*, 1994 e 1996). Morgane *et al.* (2002) relataram a ocorrência de déficits significativos na formação hipocampal devido à desnutrição protéica pré-natal, especialmente com relação às células piramidais (macroneurônios).

Diferentes estudos demonstraram a participação do sistema de neurotransmissão GABAérgico (MCGAUCH, 1989) e colinérgico (LAMBERTY; GOWER, 1991) nos processos de aprendizagem e memória espacial; assim, a compreensão das alterações produzidas pela desnutrição nestes dois sistemas é de grande importância para o presente estudo. Com relação ao sistema GABAérgico, alguns autores mostraram que a desnutrição protéica leva a uma redução nos níveis de GAD (glutamato descarboxilase) e GABA (ácido gama-aminobutírico) no SNC. No entanto, os estudos também mostraram que os níveis tanto de GAD quanto de GABA parecem ser restaurados quando os animais são nutricionalmente recuperados (WIGGINS *et al.*, 1984). Andrade e Paula-Barbosa (1996) também observaram em seus estudos que os ratos que sofreram uma desnutrição protéica apresentaram alterações do sistema GABAérgico na formação hipocampal, como uma redução na densidade de neurônios GABAérgico no giro denteado. Almeida *et al.* (1996) relataram que a desnutrição em estágios iniciais da vida causa alterações permanentes no sistema de neurotransmissão GABA-Benzodiazepínico refletindo uma hiporeatividade às drogas benzodiazepínicas nos animais desnutridos. Tonkiss *et al.* (2000) observaram em

seus estudos mudanças funcionais no sistema GABAérgico em consequência da desnutrição.

Na literatura são relatadas várias alterações no sistema colinérgico e alguns desses relatos são conflitantes. Wiggins *et al.* (1984) relatam que há uma redução nos níveis de acetilcolina. Quanto à atividade da acetilcolinesterase, esta pode sofrer alterações em algumas regiões do SNC, podendo estar aumentada, diminuída ou até mesmo com sua atividade normal dependendo da região cerebral (WIGGINS *et al.*, 1984). Há estudos relatando que a desnutrição protéica leva a uma diminuição do *binding* dos receptores muscarínicos colinérgicos no corpo estriado e hipotálamo e retardo na ontogênese dos receptores muscarínicos do córtex motor de ratos (WIGGINS *et al.*, 1984) e uma redução da densidade de receptores M2 muscarínicos nas células piramidais de regiões CA1 e CA3 do hipocampo aos 15 e 220 dias de idade (ALMEIDA *et al.*, 1996). Almeida *et al.* (1996) também mostraram que animais desnutridos são hipo-reativos às drogas psicotrópicas que atuam nos sistemas Gaba-benzodiazepínico, catecolaminérgico, serotoninérgico e opióide.

A desnutrição também produz alterações na neurofisiologia, como a redução da excitabilidade dos neurônios e da velocidade de condução das fibras córtico-espinhais (QUIRK *et al.*, 1995). Uma das mais importantes alterações eletrofisiológicas encontradas é o prejuízo na plasticidade sináptica (GALLER *et al.*, 1995). Estas alterações na plasticidade sináptica produzidas pela desnutrição pré e pós-natal podem fornecer informações de como este insulto nutricional afeta o desenvolvimento cerebral em relação aos problemas a longo prazo na atenção, aprendizagem e memória (MORGANE *et al.*, 1993). Os principais tipos de alterações sinápticas encontradas estão relacionados com LTP (Potenciação de Longa Duração) e com o *kindling*.

A LTP (do inglês *long-term potentiation*) é um aumento duradouro da resistência sináptica induzida por uma estimulação de alta frequência e tem recebido considerável atenção como um modelo para a formação da memória (MORGANE *et al.*, 1993). Esse fenômeno apresenta várias propriedades em comum com a memória: indução rápida, especificidade para um estímulo, manutenção por longos períodos e expressão imediata quando é novamente aplicado o estímulo original (IZQUIERDO, 1994). Alguns estudos mostraram que a desnutrição causa modificações na LTP. Austin *et al.* (1986) observaram que a desnutrição pré-natal, em ratos, provoca uma diminuição na habilidade de adquirir e manter o EPSP (Potencial Excitatório Pós-Sináptico), componente da LTP.

O fenômeno *kindling* refere-se a uma progressiva intensificação de respostas eletrográficas e comportamentais produzidas por atividades convulsivas (MORGANE *et al.*, 1993; GALLER *et al.*, 1995). Com a desnutrição, os ratos demonstraram alterações em vários parâmetros de *kindling* (AUSTIN-LAFRANCE *et al.*, 1991; MORGANE *et al.*, 1993). Foram relatadas também modificações no padrão de eletroencefalograma (EEG), associadas ao comportamento do sono, em animais desnutridos pré e pós-natalmente. As principais alterações encontradas estão no padrão do ritmo de onda teta gerado na região CA1 do hipocampo e giro denteado durante o sono REM (*Rapid Eyes Movement*), indicando um prejuízo na maturação do sistema neural envolvido na geração e modulação desse ritmo (MORGANE *et al.*, 1992; 1993).

Prejuízos na aprendizagem e memória espacial foram correlacionados com as alterações fisiológicas e neuroanatômicas da formação hipocampal, principalmente das regiões CA3 e CA4, como também as alterações nas células granulares do giro denteado

em animais que foram desnutridos na fase pré e pós-natal (JORDAN *et al.*, 1982; MORGANE *et al.*, 1993).

O'Keefe e Nadel (1978) relataram que o hipocampo atua na aprendizagem e armazenamento da representação do ambiente espacial codificando-o em mapas cognitivos. Este conceito de mapa cognitivo refere-se ao estabelecimento de representações de pistas associadas a um local e das posições relativas a estes locais, capacitando o organismo a utilizar estas representações. Os mapas são construídos ao longo das interações do organismo com os objetos e estímulos do ambiente. Esta teoria sustenta que os animais podem estabelecer relações espaciais entre os objetos no ambiente e relacionar estes eventos com o contexto espacial em que ocorre. Estes mesmos autores relatam, ainda, a existência de um outro sistema de localização espacial denominado de “sistema de taxon”, o qual não dependeria da formação hipocampal.

Importantes estudos comportamentais vêm sendo realizados com o objetivo de investigar os efeitos da desnutrição precoce na aprendizagem e memória espacial em ratos (WOLF *et al.*, 1986; CASTRO; RUDY, 1987; BEDI, 1992; CÓRDOBA *et al.*, 1994; FUKUDA *et al.* 2002; VALADARES; ALMEIDA, 2005) e os resultados obtidos são conflitantes. Isto se deve à grande variedade nos modelos utilizados para produzir a desnutrição ou para testar o comportamento dos animais.

A aprendizagem e memória espacial são processos imprescindíveis para a sobrevivência do organismo em certas condições ambientais. A memória não pode ser definida de maneira simples, como se fosse a simples recordação ou lembrança de eventos que ocorreram no passado. Trata-se de processos complexos que envolvem vários fatores neuroanatômicos, neurofisiológicos, neuroquímicos, comportamentais e ambientais. De

modo geral, podemos definir memória como sendo um processo que envolve a capacidade dos animais de aquisição, armazenamento e evocação das informações (KESSELS *et al*, 2001). Outros autores definem a memória como sendo a capacidade de alterar o comportamento em função de experiências anteriores, definição essa que também pode ser atribuída à aprendizagem (CATÂNIA, 1998).

Estudos com modelos animais têm mostrado que a formação da memória envolve uma série de alterações bioquímicas em várias áreas do SNC, entre as quais se destaca o hipocampo. Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória incluem, inicialmente, a ativação de receptores glutamatérgicos e a ativação de cascatas bioquímicas dos neurônios. Além dos mecanismos envolvidos diretamente na formação da memória, esta pode ainda ser modulada pela ação de vários neurotransmissores, neuromoduladores e hormônios (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000).

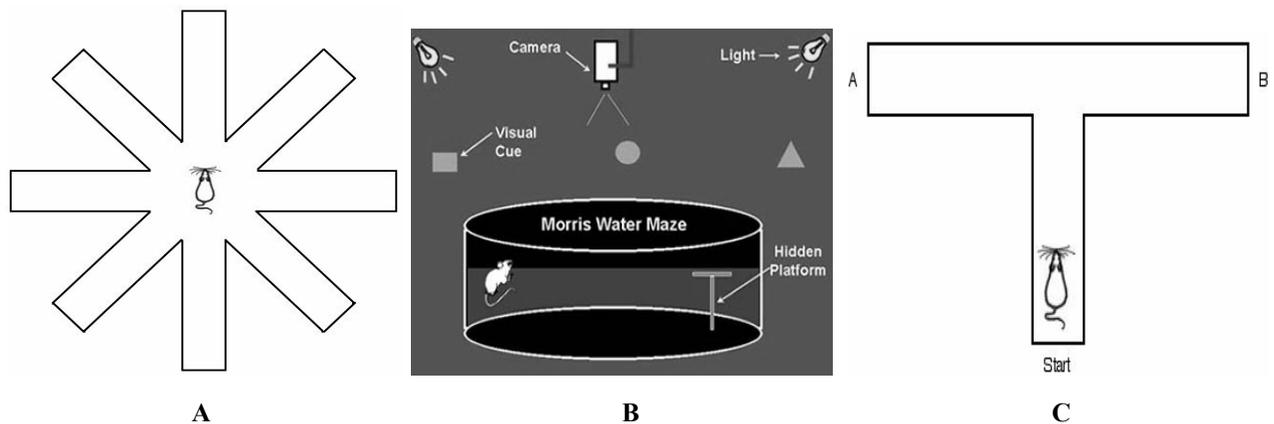
A memória é composta de múltiplos sistemas independentes que trabalham de forma cooperativa (TOMAZ, 1999). Na memória de curto prazo ocorre o armazenamento de pequenas quantidades de informações por um período de tempo limitado, enquanto que na memória de longo prazo são armazenadas grandes quantidades de informações por um período de tempo indeterminado. Segundo Baddeley e Hitch (1974) e Baddeley (2003) a os conceitos de memória de curto prazo e memória de longo prazo foram ampliados para memória operacional e memória de referência, respectivamente. De acordo com estes autores, a memória operacional é composta por uma central executiva auxiliada por dois subsistemas de suporte responsáveis pelo arquivamento temporário e manipulação de informações: sistema visuo-espacial e fonológico. A central executiva é um sistema com capacidade limitada responsável pela conexão entre os sistemas de suporte e a memória de

longa duração e seria a responsável pela seleção de estratégias e planos. Enquanto. Dentre os subsistemas, o sistema fonológico (alça fonológica) é o responsável pelo processamento do material verbal, enquanto o sistema visuo-espacial pelo processamento do material visual e espacial. Posteriormente, um quarto componente foi inserido ao modelo denominado buffer episódico, fracionado da central executiva, no qual a informação evocada da memória de longa duração tornaria-se consciente (BADDELEY, 2000).

Olton (1979) e Olton e Paras (1979), em seus estudos sobre aprendizagem e memória espacial, descreveram que o tempo cronológico não seria o fator determinante sobre a manutenção ou não de uma informação, mas sim o processamento inicial que a originou. Assim, as informações apresentadas em contextos temporais específicos seriam organizadas por um sistema de memória denominado de *memória operacional*, sendo mantidas por curtos períodos de tempo. As informações que são utilizadas em diferentes situações e que, portanto, independem do contexto específico, seriam arquivadas sob a forma de *memória de referência* e podem se armazenadas por diferentes intervalos de tempo, ou até mesmo por toda a vida do indivíduo.

No labirinto aquático é possível criar diferentes procedimentos comportamentais que permitem estudar alguns desses sistemas de memória citados.

O desempenho de ratos desnutridos em tarefas que procuram avaliar os comportamentos de aprendizagem e memória foi estudado utilizando diferentes testes, tais como o labirinto radial (JORDAN *et al.*, 1981; HALL, 1983); o labirinto em T elevado (TONKISS; GALLER, 1990) – tarefa de alternância espacial; labirinto radial de oito braços (WOLF *et al.*, 1986) e o labirinto aquático de Morris (GOODLETT *et al.*, 1986; CASTRO; RUDY, 1987; CAMPBELL; BEDI, 1989; BEDI, 1992; CÓRDOBA *et al.*, 1994).



**Figura 1** – Desenhos esquemáticos dos aparatos utilizados nos testes de memória espacial, como Labirinto Radial de 8 braços (A), Labirinto Aquático de Morris (B) e Labirinto em T (C).

Morris (1981) descreveu uma metodologia que permite utilizar duas formas de navegação espacial. Em ambas as formas, o rato é colocado numa piscina circular com água e permitido nadar em direção a uma plataforma. Uma das versões é chamada “pista proximal”, onde a plataforma é visível e o rato nada diretamente para esta pista proximal. Nesta versão, o animal não precisa estabelecer relações espaciais entre objetos, ele se orienta por esta pista específica, utilizando assim o “sistema de táxon”.

A outra versão é chamada de “pista distal”, e a plataforma fica submersa e colocada em uma posição fixa relativa às pistas que estão fora do labirinto. O rato, para aprender a localização da plataforma, tem que utilizar pistas ambientais extra-labirinto para navegar até a plataforma. Esta versão com pista distal força o uso de estratégias de mapeamento espacial. Estas duas formas foram testadas em ratos com danos hipocâmpais, cujo desempenho foi prejudicado somente na navegação através de pistas distais (MORRIS, 1981). Quando está sendo investigada a memória de referência espacial, a plataforma permanece numa posição fixa em um dos quadrantes. Vários estudos mostram que animais

mantidos em condições ideais são capazes de aprender a localizar a plataforma utilizando as pistas espaciais presentes no local (distais ou proximais). Entretanto, animais que foram expostos a algum procedimento que possa ter resultado em alterações no SNC, como a desnutrição protéica precoce, apresentam déficits na tarefa de localizar a plataforma espacialmente (CASTRO; RUDY, 1987; BEDI, 1992; CÓRDOBA *et al.*, 1994; FUKUDA *et al.*, 2002; VALADARES; ALMEIDA, 2005).

A utilização do labirinto aquático de Morris, segundo Bedi (1991), oferece vantagens quando comparado a outros testes, pois não é necessária a utilização de privação de alimento, ou reforços, para motivar o comportamento dos animais durante o procedimento de aprendizagem espacial. É sabido que animais previamente desnutridos têm uma maior motivação para reforços apetitivos, quando comparados aos animais bem nutridos (SMART; DOBBING, 1977; TONKISS; GALLER, 1990; TONKISS *et al.*, 1994). Desta forma, a utilização do labirinto aquático de Morris pode evitar alguns parâmetros confusos relacionados à motivação por alimento nos animais desnutridos.

Fukuda *et al.* (2002) testaram o desempenho de animais desnutridos (durante 49 dias e recuperados nutricionalmente) em duas tarefas de navegação espacial no labirinto aquático de Morris, avaliando a memória espacial de referência. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a desnutrição prejudicou o desempenho dos ratos quando é requerido o uso de estratégia de mapeamento espacial (plataforma submersa), tanto durante a aquisição da tarefa quando depois de 28 dias (teste de retenção). Porém, quando a tarefa não exige a utilização de mapeamento espacial (plataforma visível), não houve diferenças no desempenho de animais desnutridos e controle.

Valadares e Almeida (2005) avaliaram os efeitos da desnutrição durante a lactação (21 dias) sobre a memória espacial de referência no labirinto de Morris, utilizando diferentes práticas durante o treino. Não foram encontradas diferenças no desempenho de animais desnutridos e controle quando utilizado o protocolo experimental com práticas condensadas (8, 12 ou 24 tentativas diárias). No entanto, quando utilizada as práticas espaçadas (1 ou 4 tentativas) houve um prejuízo no desempenho dos animais desnutridos. Esses mesmos resultados foram encontrados no teste de retenção, realizado sete e 28 dias após a aquisição do aprendizado.

A memória operacional também vem sendo estudada no labirinto aquático de Morris utilizando procedimentos semelhantes, porém, com a plataforma oculta sendo mudada de posição a cada sessão. Esta é uma tarefa de relativa dificuldade para os animais, uma vez que as informações utilizadas para localizar a plataforma em um determinado momento, podem não ser mais eficientes em um outro sendo descartadas, caracterizando o uso da memória operacional. Esta tarefa é muito utilizada pelos pesquisadores nas investigações sobre os efeitos de diversas desordens neurológicas sobre a memória.

Morris (1984) realizou um experimento com duas tentativas por dia: na primeira tentativa o animal podia nadar até encontrar a plataforma, permanecendo sobre a mesma durante 60 segundos e na segunda tentativa, a plataforma foi colocada no mesmo local. O objetivo do trabalho era saber se o animal conseguiria se beneficiar, na segunda tentativa, das informações adquiridas durante a primeira tentativa e encontrar a plataforma mais rapidamente; os resultados comprovaram a hipótese.

Parece que as memórias espaciais de referência e operacional envolvem a participação da formação hipocampal no seu processamento. Entretanto, Pothuizen *et al.*

(2004) investigaram envolvimento de diferentes áreas do hipocampo (ventral e dorsal) dependendo do tipo de memória espacial (referência e operacional). As lesões completas do hipocampo (ventral e dorsal), assim como as lesões somente no hipocampo dorsal causaram prejuízos tanto na memória espacial operacional quanto na memória de referência. No entanto, as lesões somente do hipocampo ventral não causaram prejuízos em ambos os tipos de memória espacial, comprovando a existência de uma dissociação funcional entre o hipocampo dorsal e ventral.

Muitos pesquisadores vêm usando as tarefas de memória operacional para se estudar os efeitos da idade sobre os processos de aprendizagem e memória. Os testes de memória são realizados em diferentes idades e comparados para se investigar o seu declínio. Baseado nisso, Van Groen *et al.* (2002) realizaram um estudo para se testar a hipótese de que os ratos podem armazenar as informações de tarefas espaciais por 12 meses. Os autores utilizaram a tarefa de memória espacial operacional no labirinto aquático com a plataforma oculta mudando de posição a cada sessão. No experimento 1 foram utilizados dois grupos de animais: um com 12 meses de idade, submetido a uma semana de treino prévio no labirinto aquático e retestados 12 meses depois, e o outro submetido somente ao teste com 24 meses de idade sem treino prévio. No experimento 2, foram utilizados os mesmos procedimentos, exceto que os grupos submetidos ao treino prévio passavam por duas semanas de treinamento. Os resultados demonstraram que os animais com 24 meses de idade, submetidos aos treinos prévios, apresentaram um melhor desempenho em encontrar a plataforma. Isto mostra que houve a retenção das informações espaciais apresentadas anteriormente.

Além do labirinto aquático de Morris, o labirinto em T também é utilizado para se avaliar a memória operacional. O labirinto em T consiste de uma passagem principal conectada a dois braços, no qual o animal deverá entrar para ser reforçado. Uma porta manualmente operada é utilizada para fechar as entradas destes braços, forçando o animal a entrar no outro braço, não bloqueado, para receber sua recompensa alimentar. Inicialmente é realizado o treinamento do animal, bloqueando cada braço alternadamente. Posteriormente, inicia-se a fase de teste com tentativas pareadas (forçada e de escolha) quando o animal deverá alternar suas entradas nos braços para encontrar a recompensa. Neste tipo de tarefa pode ser avaliada a memória operacional (curto prazo), sendo que o animal precisará lembrar em qual braço esteve numa tentativa para que possa alternar na seguinte.

Para se estudar os efeitos de psicoestimulantes sobre a memória operacional, Stefani e Moghaddam (2002) utilizaram a tarefa de alternância com tentativas pariadas no labirinto em T. Os autores observaram que tratamentos repetidos com os psicoestimulantes, dependendo das doses utilizadas e do atraso entre os pares de tentativas, podem causar prejuízos no desempenho da memória operacional.

Nos experimentos realizados no labirinto em T, geralmente utiliza-se recompensa alimentar como reforço às escolhas corretas. Para isso, os animais devem passar por um procedimento de privação antes dos testes. Sendo assim, o labirinto em T em uma versão aquática seria mais apropriado na investigação dos efeitos da desnutrição protéica sobre as tarefas de memória operacional, evitando-se assim os problemas de motivação para reforços alimentares que os animais desnutridos poderiam apresentar.

O labirinto em T aquático é construído de chapa galvanizada e colocado em um tanque circular preenchido por água. Uma plataforma é colocada em um dos braços do labirinto, por onde o animal terá que subir para fugir da água e isto funciona como reforço para a tarefa, uma vez que a água é considerada um estímulo aversivo.

Além da memória espacial de referência e memória espacial operacional, a formação hipocampal também participa no processamento da *memória de reconhecimento*, que vem sendo estudada através da *tarefa de reconhecimento de objetos*. Esta tarefa de reconhecimento de objetos é muito usada em humanos para se caracterizar doenças que causam problemas de memória (amnésia), testando a memória operacional não-espacial (DODART *et al.*, 1997).

O reconhecimento de objetos pode ser percebido através da preferência que os ratos demonstram em explorar mais os objetos novos do que os já familiarizados (GARCÍA-MORENO *et al.*, 2002). A tarefa consiste em colocar o animal inicialmente frente a um objeto e, após um tempo, expor novamente este mesmo animal ao objeto apresentado anteriormente juntamente com um novo objeto. A memória de reconhecimento é avaliada comparando o tempo gasto pelo animal explorando cada objeto durante a segunda tentativa. Os estudos mostram que os ratos normalmente gastam mais tempo explorando o novo objeto do que o já apresentado (DODART *et al.*, 1997; GARCÍA-MORENO *et al.*, 2002; OBINU *et al.*, 2002). Nestes testes o fator tempo exerce um importante papel, uma vez que estão envolvidas atividades comportamentais que necessitam de tempo para serem processadas, como a formação da memória de longo prazo.

Dodart *et al.* (1997) investigaram os efeitos da escopolamina (antagonista colinérgico) sobre a tarefa de reconhecimento de objetos em duas-tentativas. Os autores

utilizaram uma bolinha de gude e um dado de plástico como objetos para o teste de reconhecimento no campo aberto. Com o tempo gasto em cada objeto calculou-se o índice de reconhecimento ( $\text{Tempo B} \times 100 / \text{Tempo A} + \text{Tempo B}$ ). Os resultados mostraram que os animais que receberam a escopolamina apresentaram um déficit significativo no reconhecimento dos objetos e na atividade exploratória, concluindo que o desempenho nesta tarefa de reconhecimento requer a integridade do sistema colinérgico central.

García-Moreno *et al.* (2002) também utilizaram a tarefa de reconhecimento de objetos para investigar os efeitos do álcool a longo prazo, baseando-se na hipótese que a exposição ao álcool produz alterações no SNC, principalmente na formação hipocampal e os resultados obtidos confirmaram a hipótese.

A atividade exploratória dos animais no campo aberto também pode ser investigada e complementa a investigação dos efeitos da desnutrição protéica sobre o SNC e comportamento dos animais. A análise baseia-se no comportamento dos animais perante ambiente novos. Estes tipos de tarefas são classificados como aprendizagem não associativa, na qual são adquiridas quando a exposição contínua e repetida de um estímulo novo muda a resposta comportamental do animal perante este estímulo (VIANNA *et al.*, 2000).

Na literatura existem muitos trabalhos investigando as alterações na memória espacial operacional e na memória de reconhecimento decorrentes de diversos procedimentos (farmacológicos e morfológicos). Porém, não há estudos investigando os efeitos de um mesmo modelo de desnutrição em diferentes tarefas de aprendizagem e memória. Esta investigação é de grande importância considerando a relevância dos comportamentos de aprendizagem e memória espacial na sobrevivência dos animais em

seus ambientes naturais. Também se deve considerar a importância dos estudos sobre os prejuízos da desnutrição sobre os processos cognitivos, extrapolando estes efeitos para os humanos, devido à grande incidência da desnutrição em países subdesenvolvidos.

***Objetivos***

---

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

Com base na literatura apresentada, os objetivos do presente trabalho foram de investigar os efeitos de um mesmo modelo de desnutrição protéica imposta no início da vida sobre os processos de aprendizagem e memória espacial operacional e de reconhecimento.

### **Objetivos específicos**

Investigar os efeitos da desnutrição protéica pós-natal em ratos adultos, recuperados nutricionalmente sobre:

1. A memória espacial operacional e memória a longo prazo (seis meses) no labirinto aquático de Morris;
2. A memória de reconhecimento em tarefas de reconhecimento de dois objetos no campo aberto com dois tipos de intervalos (3 e 24 horas) entre as tentativas de habituação e reconhecimento;
3. Atividade exploratória no campo aberto com os intervalos de três e 24 horas;
4. A memória operacional em tarefas de alternância no labirinto em T aquático com dois tipos de intervalos entre as tentativas pareadas (10 e 30 segundos).

## *Material e Método*

---

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

#### **Animais**

Foram utilizados 118 ratos albinos, machos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram recebidos no dia do nascimento e transportados ao Biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento, onde ficaram até o período de testes.

#### **Composição das Ninhadas**

Cada ninhada foi composta pela rata-mãe com seis filhotes machos e duas fêmeas, sendo os filhotes escolhidos aleatoriamente para se evitar a formação de grupos com filhotes provenientes da mesma rata-mãe. As ninhadas foram designadas aleatoriamente para receberem dietas balanceadas de 16% (grupo controle) ou 6% de proteína (grupo desnutrido) e mantidas num ciclo claro-escuro de 12 horas e com temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ).

#### **Manutenção das Ninhadas**

Durante a fase de lactação (0 a 21 dias de vida), os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, medindo 41 x 40 x 17 cm, com tampa gradeada, comedouro de vidro e bebedouro de plástico, forradas com raspas de madeira e alimentados com dietas de 6% ou 16% de proteína. Tanto as ratas-mães quanto os filhotes foram pesados semanalmente (0, 7, 14 e 21 dias de idade).

### Manutenção dos Animais Pós-desmame

Aos vinte e um dias, os animais de ambos os grupos foram desmamados e colocados em gaiolas individuais de polipropileno e alimentados com as mesmas dietas da fase de lactação até os 49 dias. A partir do 49º dia, os animais de ambas as condições nutricionais (controle e desnutridos) passaram a receber dieta comercial contendo 22% de proteína até o 70º dia de idade, quando se iniciaram os testes comportamentais (Tabela 1). Durante todo o período de lactação (0-21 dias) e pós-lactação (21-70 dias), os animais tiveram livre acesso à água e alimento e o biotério mantido num regime de temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e no mesmo ciclo claro-escuro da fase de lactação.

A pesagem dos animais foi realizada semanalmente durante todo o período de lactação (0, 7, 14 e 21 dias) e pós-lactação (28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias de idade).

**Tabela 1:** Procedimento experimental referente ao tratamento nutricional durante as fases de lactação e Pós-lactação.

Grupo	Lactação	Tratamento Pós-lactação	
	0 – 21 dias	22 – 49 dias	50 – 70 dias
Controle	16% de Proteína	16% de proteína	Dieta Comercial
Desnutrido	6% de Proteína	6% de Proteína	Dieta Comercial

### Composição e Preparo das dietas

A dieta foi preparada de acordo com Barnes *et al.* (1968), a partir de modificações descritas por Santucci *et al.* (1994) e Rocinholi *et al.* (1997), com a mistura salina e a vitamínica preparadas segundo recomendações do American Institute of Nutrition

(AIN,1993). A porcentagem de carboidrato foi aumentada na dieta com deficiência de proteína para a obtenção de dietas isocalóricas. Quanto aos outros nutrientes, as porcentagens foram as mesmas para ambos os tipos de dieta (6% e 16% de proteína). A dieta foi suplementada com L-metionina em 2,0 g/Kg de proteína, uma vez que a caseína é deficiente desse aminoácido.

Os componentes da dieta e suas respectivas porcentagens estão representados na Tabela 2. Nas Tabelas 3 e 4 estão representadas as composições das Misturas Vitamínica e Salina.

**Tabela 2:** Composição e proporção dos nutrientes (%) da dieta utilizada nas fases de lactação (0 a 21 dias) e pós-lactação (22 a 49 dias).

COMPONENTES	CONTROLE	DESNUTRIDO
Proteína (Caseína)	16,0	6,0
Metionina	0,032	0,012
Gordura	8,0	8,0
Mistura Salina	5,0	5,0
Mistura Vitamínica	1,0	1,0
Colina	0,2	0,2
Amido	69,768	79,788
Total	100,0	100,0

**Fornecedores:** Proteína – Caseína (SKF, Alemanha); L – metionina (Dyets, USA); Gordura – Óleo de milho (Mazola® Refinarias de Milho, Brasil); Mistura Salina (Rhoster, Indústria e Comércio Ltda., Brasil); Mistura Vitamínica (Rhoster, Indústria e Comércio Ltda., Brasil); Colina (Rhoster, Indústria e Comércio Ltda., Brasil); Carboidrato – Amido de Milho (Maizena® Refinarias de Milho, Brasil)

**Tabela 3** - Mistura Vitamínica. Composição Básica do suplemento vitamínico para animais de laboratório - AIN-93 (American Institute of Nutrition).

Ácido fólico	200mg	vitamina A	400.000UI
Ácido Nicotínico	3.000mg	vitamina B12	2.500mcg
Biotina	20.000mcg	vitamina D3	100.000UI
Pantotenato de cálcio	1.600mg	vitamina E	7.500UI
Piridoxina	700mg	vitamina K1	75.000UI
Riboflavina	600mg	sacarose	97.465%
Tiamina	600mg		

**Tabela 4** - Mistura Salina: Composição Básica do suplemento mineral para animais de laboratório - AIN – 93

Boro	14.26mg	magnésio	14.48g
Cálcio	142.94	manganês	300mg
Cloro	44.90g	molibdênio	4.32mg
Cobre	172.41	níquel	14.31mg
Cromo	28.65mg	potássio	102.87g
Enxofre	8.60g	selênio	4.28mg
Ferro	1000mg	silício	143.26mg
Flúor	28.72mg	sódio	29.38g
Fósforo	44.61g	vanádio	2.87mg
Iodo	5.93mg	zinco	860mg
Lítio	2.85mg		

Durante o período de recuperação nutricional (49 a 70 dias de idade), foi oferecida aos animais ração comercial do laboratório NUVILAB – CR 1, para camundongos e ratos fabricado pela Nuvital Nutrientes Ltda. – Colombo, Paraná, contendo 22% de proteína. A Tabela 5 mostra a composição da ração comercial utilizada.

**Tabela 5** - Composição da Dieta Comercial NUVILAB – CR1 – Nuvital Ltda**COMPOSIÇÃO BÁSICA DO NUVILAB CR 1**

1. Carbonato de Cálcio
2. Farelo de Milho
3. Farelo de Soja
4. Farelo de Trigo
5. Fosfato Bicálcico
6. Cloreto de Sódio
7. Premix Mineral Vitamínico
8. Aminoácido

**SUPLEMENTAÇÃO POR QUILO:**

Vitamina A	12.000 UI	Colina	600,00 mg
Vitamina D3	1.800 UI	Metionina	300 mg
Vitamina E	30,00 mg	Ferro	50,00 mg
Vitamina K3	3,00 mg	Zinco	60,00 mg
Vitamina B1	5,00 mg	Cobre	10,00 mg
Vitamina B2	6,00 mg	Iodo	2,00 mg
Vitamina B6	7,00 mg	Manganês	60,00 mg
Vitamina B12	20 mcg	Selênio	0,05 mg
Niacina	60,00 mg	Cobalto	1,50 mg
Ácido pantotênico	20,00 mg	DL-metionina	300,00 mg
Ácido fólico	1,00 mg	Lisina	100,00 mg
Biotina	0,05 mg		

**NÍVEIS DE GARANTIA**

Umidade (Máximo)	12.50%	Matéria Fibrosa (Máximo)	8.00%
Proteína Bruta (Mínimo)	22.00%	Cálcio (Máximo)	1.40%
Extrato Etéreo (Mínimo)	4.00%	Fósforo (Mínimo)	0.80%
Matéria Mineral (Máximo)	10.00%		

## Experimento I

Nesse experimento, foi avaliado o desempenho dos animais submetidos à desnutrição protéica pós-natal e dos animais controle em tarefas de aprendizagem e memória espacial operacional no labirinto aquático de Morris.

## Equipamento

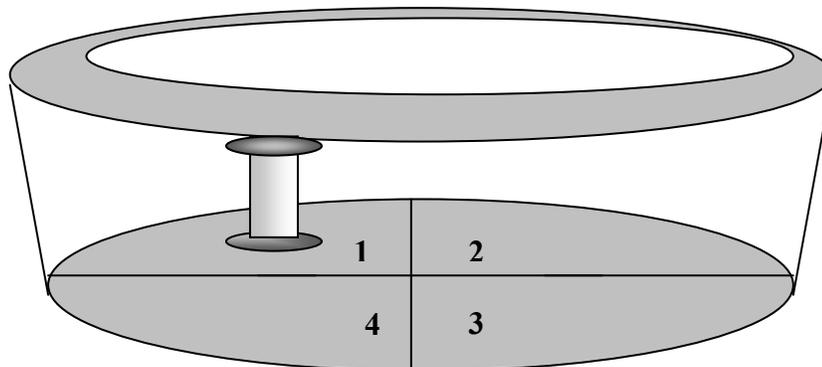
Para a realização desse experimento foi utilizado um labirinto aquático semelhante ao utilizado por Morris (1981). O labirinto aquático consiste em um tanque circular, de fibra de vidro, com 150 cm de diâmetro e 39 cm de altura, preenchido com água mantida a uma temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) (Fig. 2). Para tornar a água opaca foram adicionados 2L de leite. O labirinto aquático foi dividido em quatro quadrantes imaginários, numerados em sentido horário (quadrante 1, quadrante 2, quadrante 3 e quadrante 4).

Uma plataforma circular de 12 cm de diâmetro e 25 cm de altura foi colocada 1,5 cm abaixo da superfície da água, no centro de um dos quadrantes. A posição da plataforma oculta foi mudada de lugar a cada dia de maneira aleatória; dessa maneira está sendo testada a memória operacional desses animais. As posições da plataforma estão demonstradas na Tabela 6.

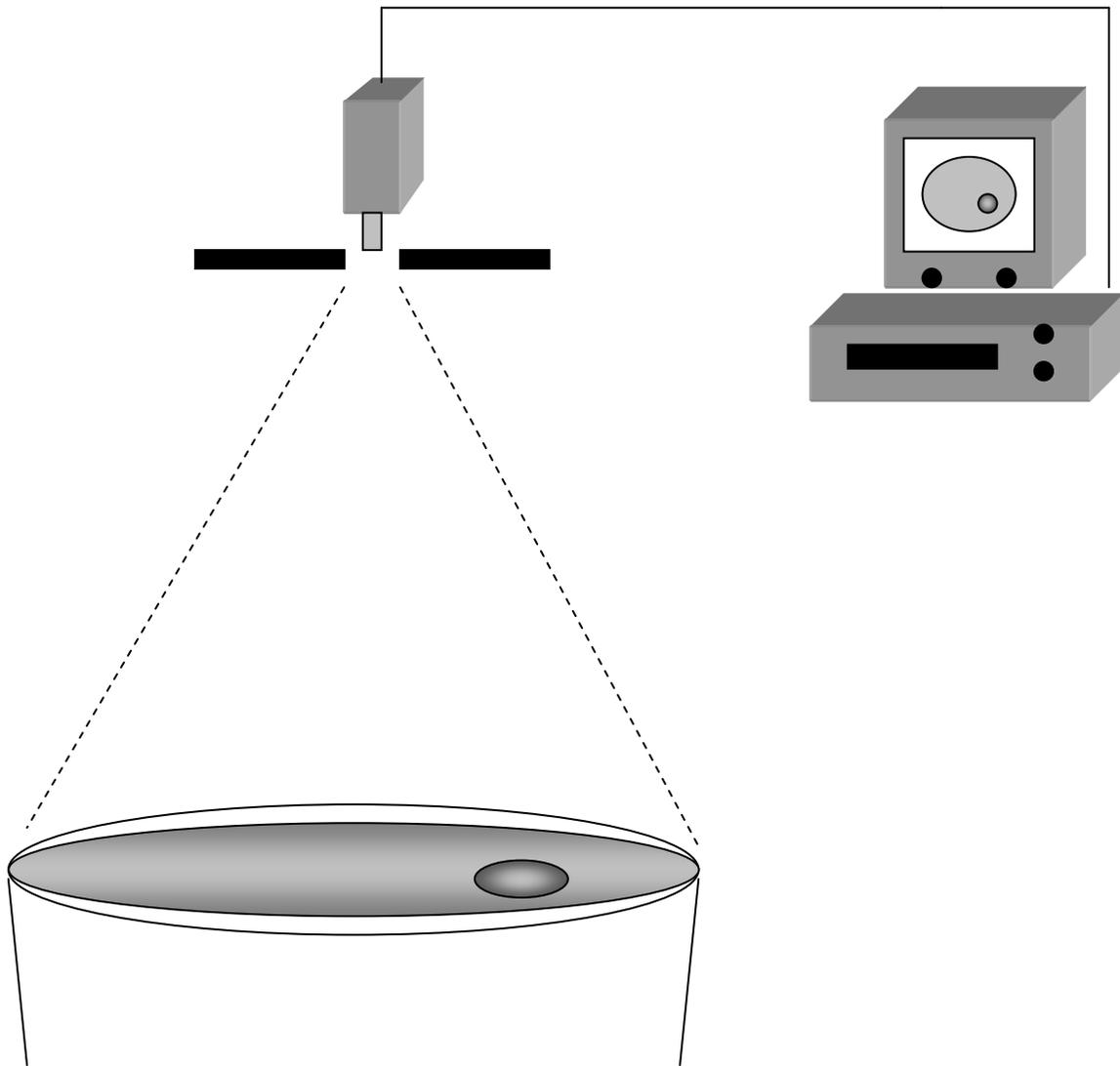
**Tabela 6** – Posições da plataforma e as posições de partida para cada sessão.

Dias	Posição da Plataforma	Posições de Partidas
1	1	2 – 4 – 3 – 4
2	3	4 – 2 – 1 – 2
3	2	3 – 1 – 4 – 1
4	4	1 – 3 – 2 – 3
5	3	4 – 2 – 1 – 2
6	1	2 – 4 – 3 – 4

O labirinto aquático estava situado no centro de uma sala ampla sobre um estrado de madeira a 8 cm acima do chão. Nas paredes da sala estavam fixadas pistas visuais como figuras. Os armários e a porta presentes na sala também serviram de pistas que ajudaram no aprendizado da navegação dos ratos. Uma câmera de vídeo (AS-3 Tracker, San Diego-USA) estava fixada acima do labirinto aquático e registrou todo o experimento para análise posterior (Fig. 3).



**Figura 2** - Divisão do Labirinto Aquático nos 4 quadrantes imaginários. A plataforma mudava de quadrante a cada dia.



**Figura 3** - Esquema do Labirinto Aquático de Morris e do sistema de captação de imagens utilizado.

## Procedimento

Os animais controle (n=14) e desnutridos (n=13), com 70 dias de idade, foram treinados no labirinto aquático de Morris com uma sessão diária contendo quatro tentativas (fase 1). Os treinos de aquisição da tarefa foram realizados em seis dias, totalizando 24 tentativas ao final desta fase. Cada animal foi colocado no centro de um dos quadrantes, de costas para o centro do labirinto e permitido nadar para encontrar a plataforma por 60 segundos. Quando o animal encontrava a plataforma permanecia no local por um intervalo de 15 segundos; quando não, era colocado sobre a plataforma pelo experimentador e permanecia ali por 35 segundos. Ao término de cada sessão diária, após secagem, os animais retornavam para suas gaiolas e só foram testados novamente no dia seguinte. O tempo que cada animal despendia para encontrar a plataforma em cada tentativa era registrado para a análise posteriormente. Este tempo é denominado latência de fuga e é esperado que diminua à medida que o animal aprende a localizar a plataforma espacialmente.

Imediatamente após o término da 24ª tentativa (6º dia) foi realizada a *probe trial*, quando a plataforma foi removida do labirinto aquático e o animal tinha 60 segundos de natação livre. O tempo gasto em cada quadrante foi registrado para análise posterior. Na *probe trial* é avaliada a precisão da aprendizagem espacial do animal, representado pelo tempo gasto no quadrante onde a plataforma se localizava anteriormente, neste caso, na última sessão de treino. Esta análise é um indicativo de que o animal utilizou uma estratégia de orientação espacial para localizar a posição da plataforma em relação às pistas visuais do ambiente (BLOKLAND *et al.*, 2004).

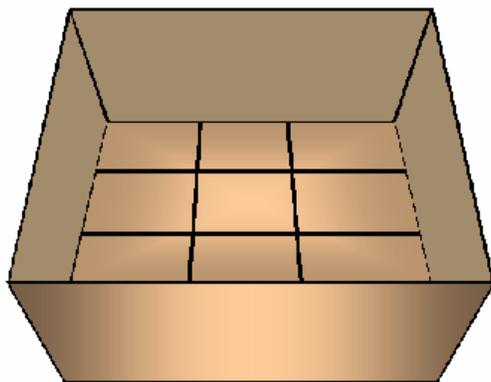
Após seis meses da realização da primeira fase, os animais foram submetidos a uma fase de “reteste” (fase 2) com os mesmos procedimentos da fase anterior, para a avaliação da memória a longo prazo dos animais controle e desnutridos.

## **Experimento II**

### **Equipamento e objetos**

Neste experimento, os animais controle (n=23) e desnutridos (n=23), com 70 dias de idade, passaram por um procedimento de reconhecimento de dois objetos para avaliação da memória de reconhecimento. Para uma melhor avaliação desta tarefa, os animais foram divididos em grupos independentes com três e 24 horas de intervalos entre as tentativas de habituação e reconhecimento.

O aparato utilizado foi um campo aberto feito de madeira (60 x 60 x 30cm). O piso do campo aberto foi dividido em nove quadrados iguais (Fig. 4). Os experimentos foram realizados em uma sala isolada de ruídos. Os objetos utilizados para o reconhecimento foram uma bolinha de gude (objeto A) e uma pedra de dominó de plástico (objeto B). Esses objetos, após cada tentativa, foram imersos em álcool (50%) para eliminar pistas olfatórias, assim como o campo aberto que era higienizado com um algodão embebido em álcool. (DODART *et al.*, 1997).



**Figura 4** - Esquema do campo aberto utilizado.

### **Procedimento**

Inicialmente os animais foram expostos ao campo aberto sem qualquer objeto, durante três dias consecutivos por um período de 15 minutos diários. No 4º dia iniciaram-se os testes de reconhecimento, no qual os animais foram colocados no campo aberto com a presença do “Objeto A”, por um período de 10 minutos (1ª tentativa – habituação). Após a 1ª tentativa, eles foram submetidos à 2ª tentativa para avaliação da memória de reconhecimento (tentativa de reconhecimento). Nesta tentativa, os animais foram novamente expostos ao campo aberto por 10 minutos, na presença dos dois objetos: o Objeto A, que já tinha sido apresentado anteriormente, e um novo objeto que foi denominado “Objeto B”. Foram utilizados diferentes intervalos intertentativas (3 e 24h).

O experimento foi registrado por uma câmera de vídeo localizada acima da caixa, para analisar o tempo que os animais gastaram explorando o Objeto A (Tempo A) e o Objeto B (Tempo B) na 2ª tentativa. Com os tempos registrados foram calculados os índices de reconhecimento (IR) para cada animal, expressado como uma razão (Tempo B x

100 / Tempo A + Tempo B). Foram considerados satisfatórios os IRs com valores maiores de 50% (Tempo B maior que o Tempo A)

A atividade exploratória também foi analisada calculando-se a quantidade de quadrados cruzados e de *rearing* (ficar sobre as duas patas) realizados pelos animais desnutridos e controle durante a realização da 1ª e da 2ª tentativa, tanto no intervalo de três horas quanto no de 24 horas.

### **Experimento III**

#### **Equipamento**

Neste experimento também foi avaliada a memória operacional dos animais controle (n=23) e desnutridos (n=22), utilizando a tarefa de alternância forçada no labirinto em T aquático. O labirinto em T Aquático é semelhante ao Labirinto em T convencional (madeira), contendo uma passagem principal de 65 cm de comprimento, 45 cm de altura e 13 cm de largura, conectada a dois braços (alvos) com 65 cm de comprimento, 45 cm de altura e 13 cm de largura. Uma porta de 45 cm de altura e 13 cm de largura foi operada manualmente para fechar um dos braços do labirinto, forçando o animal a entrar no outro braço (treino de alternância). No final de cada um dos braços havia uma plataforma que estava fixada no labirinto, onde o animal poderia subir para fugir da água. A posição da plataforma foi alternada em cada um dos braços ao longo das tentativas (direito e esquerdo).

O labirinto em T aquático foi colocado dentro de um tanque circular de 150 cm de diâmetro e 39 cm de altura, preenchido com água e adicionado 2L de leite para tornar a

água opaca, mantida a uma temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Esse tanque contendo o labirinto aquático estava localizado no centro de sala ampla, sobre um estrado de madeira 8 cm acima do chão.

### **Procedimentos**

Inicialmente os animais foram habituados ao labirinto em T em três sessões diárias. Os ratos foram colocados no labirinto e permitidos explorar livremente até encontrarem uma das plataformas que foram colocadas no final dos dois braços do labirinto em T. Ao encontrar uma delas permaneceram no local por um intervalo de 10 segundos e em seguida, após secagem, eram recolocados em suas gaiolas.

Ao término da fase de habituação os animais passaram por uma fase de treino de alternância forçada durante cinco dias consecutivos, no qual foram colocados na passagem principal do labirinto e forçados a entrar em um dos braços para encontrar a plataforma, uma vez que a entrada para o outro braço estava bloqueado. Nesta fase foram realizadas 10 tentativas diárias, na qual, em cinco tentativas o animal era forçado a entrar no braço direito e em cinco tentativas, no braço esquerdo, com um intervalo de 10 segundos entre as tentativas.

No dia seguinte, ao final da fase de treino de alternância forçada, os animais iniciaram os testes de alternância tentativa-pariada. Cada par de tentativa consistia de uma tentativa forçada, na qual os animais tinham acesso a somente um dos braços do labirinto, e tentativa de escolha, na qual os animais podiam escolher em qual braço deveriam entrar para encontrar a plataforma.

As tentativas forçada e de escolha foram separadas por um atraso ou intervalo de retenção de 10 segundos (grupo 1) e de 30 segundos (grupo 2). Durante a tentativa de escolha, somente o braço que estava bloqueado na tentativa forçada continha a plataforma e se o animal entrasse no braço onde a plataforma se encontrava anteriormente era considerado um erro de alternância. O teste terminava somente quando cada animal conseguisse atingir um critério de desempenho de 80% ou mais de acertos durante três dias consecutivos. Um intervalo de 25 segundos separava cada par de tentativa (forçada/escolha). Cada bloco de tentativas consistia de 10 pares de tentativas, com igual número de entradas nos braços direito e esquerdo, e não mais do que duas entradas forçadas consecutivas em uma mesma direção (ex: D-D-E-D-E-D-E-E-D-E), como demonstrado na Tabela 7.

**Tabela 7** - Sequências de tentativas pareadas para testes no labirinto em T aquático.

No	TENTATIVA PARIADA	SEQUÊNCIAS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Forçada	E	E	D	E	D	E	D	D	E	D
	Escolha	D	D	E	D	E	D	E	E	D	E
2	Forçada	D	E	D	D	E	D	E	E	D	E
	Escolha	E	D	E	E	D	E	D	D	E	D
3	Forçada	E	D	E	D	E	D	D	E	E	D
	Escolha	D	E	D	E	D	E	E	D	D	E
4	Forçada	D	D	E	D	E	D	E	E	D	E
	Escolha	E	E	D	E	D	E	D	D	E	D
5	Forçada	E	D	E	E	D	D	E	D	E	D
	Escolha	D	E	D	D	E	E	D	E	D	E

### **Análise estatística**

Com relação ao peso corporal dos animais, os dados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores (grupo x dia), utilizando o teste de *Newman-Keuls* para medidas repetidas (fator dia). Os dados obtidos no Experimento I foram analisados pela ANOVA de três fatores (grupo x fase x tentativa) com medidas repetidas no fator tentativas.

No Experimento II utilizou-se ANOVA de dois fatores (grupo x intervalo) para analisar a memória de reconhecimento. A atividade exploratória foi analisada pela ANOVA de três fatores (grupo x intervalo x cruzamentos), como também ANOVA de três fatores (grupo x intervalo x *rearing*).

Para o Experimento III foi utilizada ANOVA de dois fatores (dieta x intervalo). Consideram-se estatisticamente significativos os valores de  $p$  menores que 0,05.

Quando apropriado, utilizou-se o teste de *Newman-Keuls* de comparações múltiplas.

*Resultados*

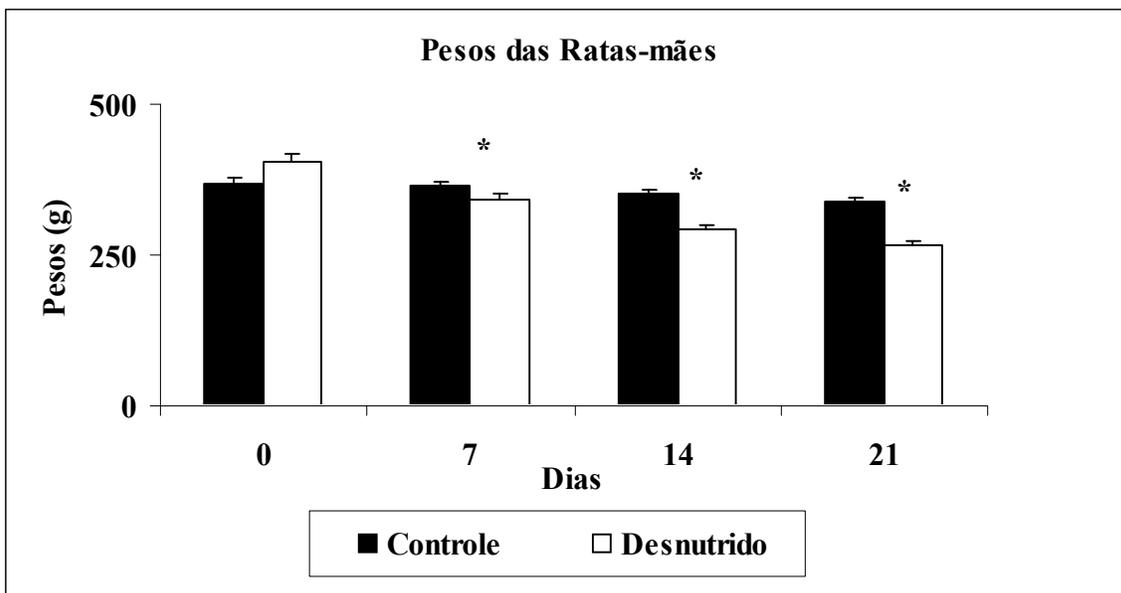
---

## 4. RESULTADOS

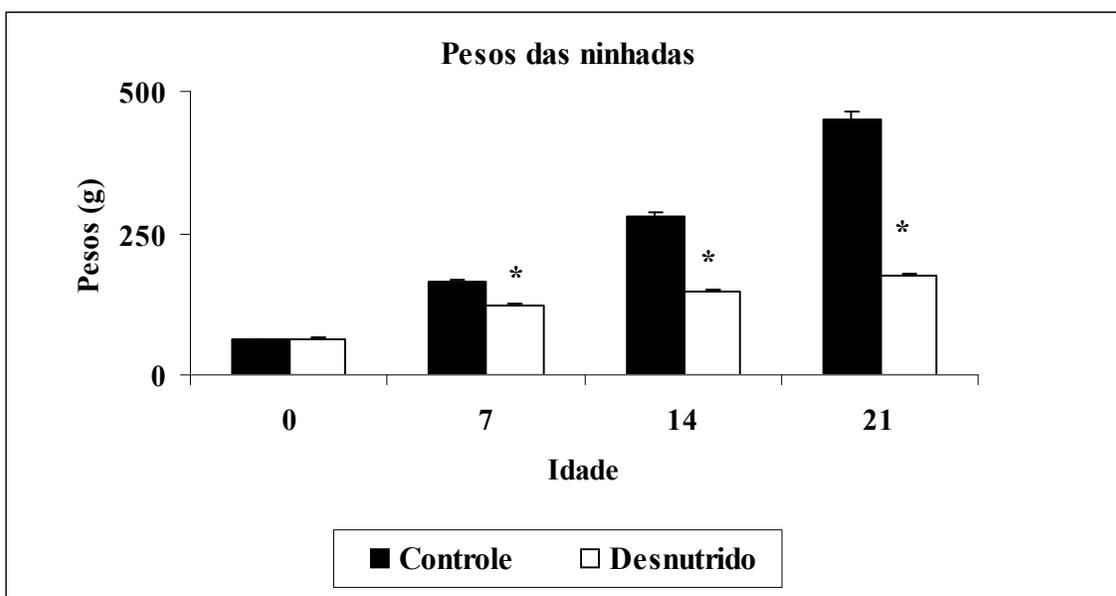
### Peso Corporal

Os dados de peso das ratas-mães (Fig. 5), ao longo dos 21 dias de lactação, revelaram um efeito significativo do fator dieta [ $F(1,42) = 6,56; p < 0,05$ ], do fator dia [ $F(3,126) = 236,96; p < 0,05$ ] e da interação dos fatores dieta x dia [ $F(3,126) = 106; p < 0,05$ ], mostrando que houve uma acentuada perda de peso corporal das ratas desnutridas, enquanto as ratas controles praticamente mantiveram seus pesos iniciais. A análise de comparação múltipla mostrou que os pesos das ratas desnutridas foram significativamente menores a partir da 1ª semana de lactação (dias 7, 14 e 21), após a introdução da dieta com deficiência de proteína. Esses dados são semelhantes aos que já foram coletados em nosso laboratório (FUKUDA *et al.*, 2002; HERNANDES & ALMEIDA, 2003; FRANÇOLIN-SILVA & ALMEIDA, 2004; VALADARES & ALMEIDA, 2005).

O peso dos filhotes na fase de lactação (Fig. 6) também apresentou efeito significativo do fator dieta [ $F(1,42) = 410,4; p < 0,05$ ], do fator idade [ $F(3,126) = 896,16; p < 0,05$ ] e da interação dos fatores dieta x idade [ $F(3,126) = 303,37; p < 0,05$ ], mostrando que neste período a diferença de peso corporal dos animais controle e desnutridos aumenta significativamente, sendo muito marcante nas últimas semanas de lactação, com os animais desnutridos chegando a pesar cerca de 60% menos que os controle.

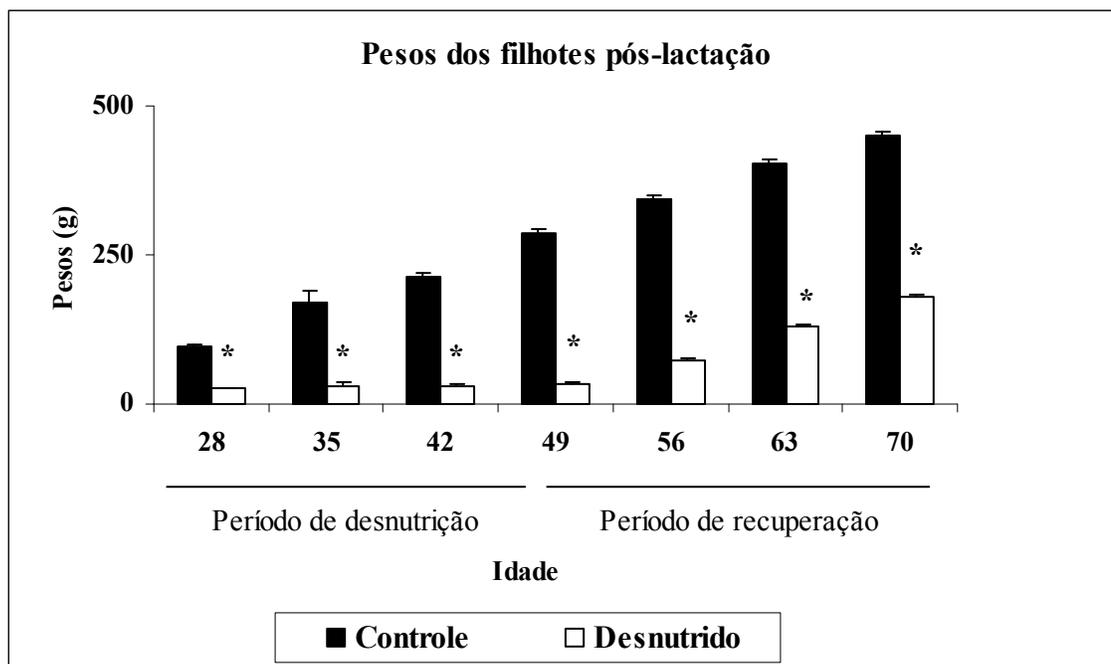


**Figura 5** – Peso corporal das ratas-mães (Média  $\pm$  EPM) controle (n=22) e desnutridas (n=22) durante o período de lactação. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.



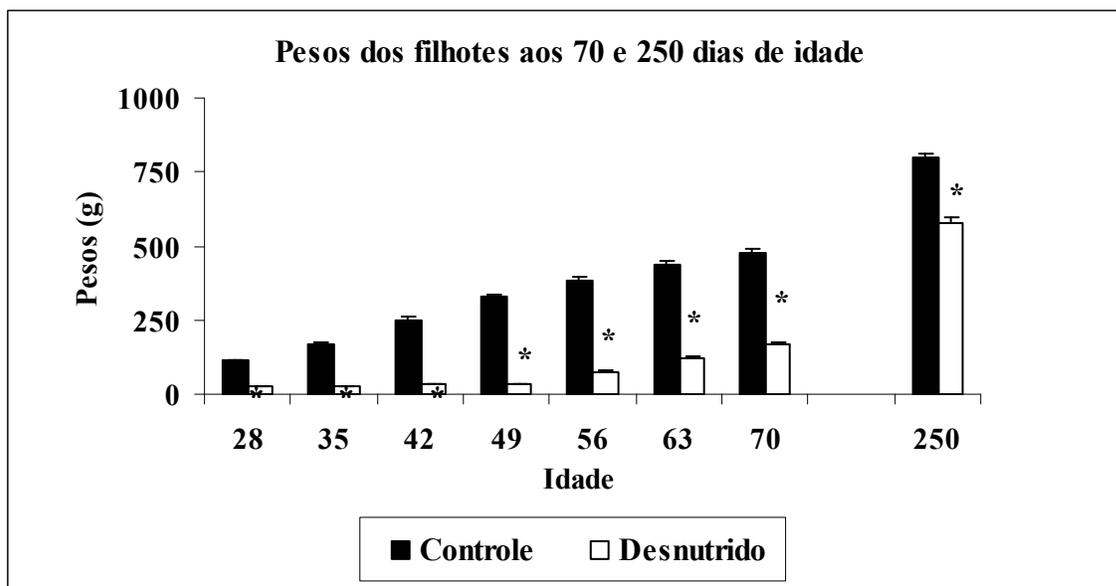
**Figura 6** – Peso corporal das ninhadas (Média  $\pm$  EPM) do grupo controle (n=22) e do desnutrido (n=22) durante o período de lactação. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

Na fase pós-lactação (Fig. 7), na qual os animais de ambos os grupos nutricionais continuaram recebendo as mesmas dietas da fase de lactação até 49 dias de idade e a partir deste momento passaram a receber dieta comercial com 22% de proteína, ainda se observa um efeito significativo do fator dieta [F (1,140) = 1279,55;  $p < 0,001$ ], do fator idade [F (6,840) = 524;  $p < 0,001$ ] e da interação dos fatores dieta x idade [F (6,840) = 99;  $p < 0,001$ ], mostrando que o peso corporal dos animais desnutridos continua sendo menor que o peso corporal do grupo controle.



**Figura 7** – Peso corporal dos filhotes (Média  $\pm$  EPM) durante o período de pós-lactação até a fase adulta (70 dias). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

Essa diferença de peso corporal persistiu por um longo período de recuperação nutricional, como observado nos animais utilizados no Experimento I, que foram novamente pesados antes da 2ª fase. A comparação dos pesos dos animais controle e desnutridos aos 70 dias (início da 1ª fase) e aos 250 dias (início da 2ª fase) mostrou que houve um efeito significativo do fato dieta [ $F(1,25) = 203,3; p < 0,001$ ], do fator idade [ $F(1,25) = 1152,07; p < 0,001$ ] e da interação dos fatores dieta x idade [ $F(1,25) = 18,11; p < 0,001$ ] (Fig. 8).



**Figura 8** – Peso corporal dos filhotes (Média  $\pm$  EPM) durante o período de pós-lactação até a fase adulta (70 dias) e na segunda fase do experimento I (250 dias de idade). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

### Medidas Comportamentais do Experimento I – Memória Espacial Operacional

Na análise das latências de fuga (tempo gasto para localizar a plataforma) dos animais controle e desnutridos, durante as seis sessões de treino, foi observado que houve

---

um efeito significativo do fator dieta [ $F(1,25) = 7,38; p < 0,05$ ] e do fator tentativa [ $F(23,575) = 10,28; p < 0,001$ ], porém, não houve efeito significativo na interação dos fatores dieta x tentativa. A latência para ambos os grupos nutricionais foram diminuindo ao longo das tentativas, chegando à 24<sup>a</sup> tentativa (dia 6) com uma redução de cerca de 80% da latência para os controle e 50% para desnutridos relativo à primeira tentativa da primeira sessão. Na primeira tentativa de cada sessão os animais gastaram um tempo maior para encontrar a plataforma que se encontrava em local diferente ao da sessão anterior realizada 24 horas antes, sendo que os desnutridos apresentaram uma latência maior relativa aos animais controle (Fig. 9).

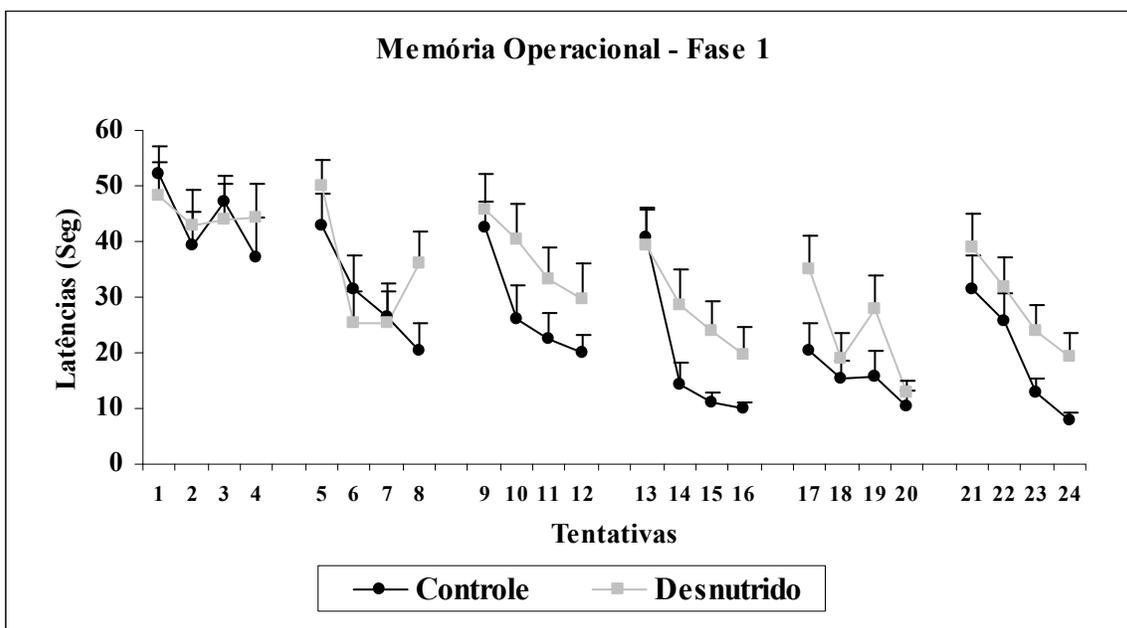
A análise do tempo gasto em cada quadrante durante a *probe trial*, realizada imediatamente após a 24<sup>a</sup> tentativa, mostrou um efeito significativo do fator quadrante [ $F(3,78) = 17,8; p < 0,001$ ] e na interação dos fatores dieta x quadrante [ $F(3,78) = 3,53; p < 0,05$ ]. Não houve efeito do fator dieta. Esses resultados mostram que ambos os grupos nutricionais lembraram onde a plataforma se localizava na última sessão do teste (quadrante 1) (Fig. 10).

Seis meses após o término da primeira fase dos experimentos os animais passaram por uma fase de “re-teste” (fase 2), na qual foram submetidos novamente aos mesmos procedimentos da fase 1, para se avaliar a retenção das informações a longo prazo. Os dados, comparando-se as fases 1 e 2, apresentaram um efeito significativo do fator dieta [ $F(1,50) = 5,46; p < 0,05$ ], do fator fase [ $F(1,50) = 61,26; p < 0,001$ ], do fator tentativa [ $F(23,1150) = 16,65; p < 0,001$ ] e na interação dos fatores dieta x fase [ $F(1,50) = 4,86; p < 0,05$ ]. Esses resultados mostram que as latências de fuga para encontrar a plataforma em ambos os grupos nutricionais foram significativamente menores na fase 2, sugerindo que,

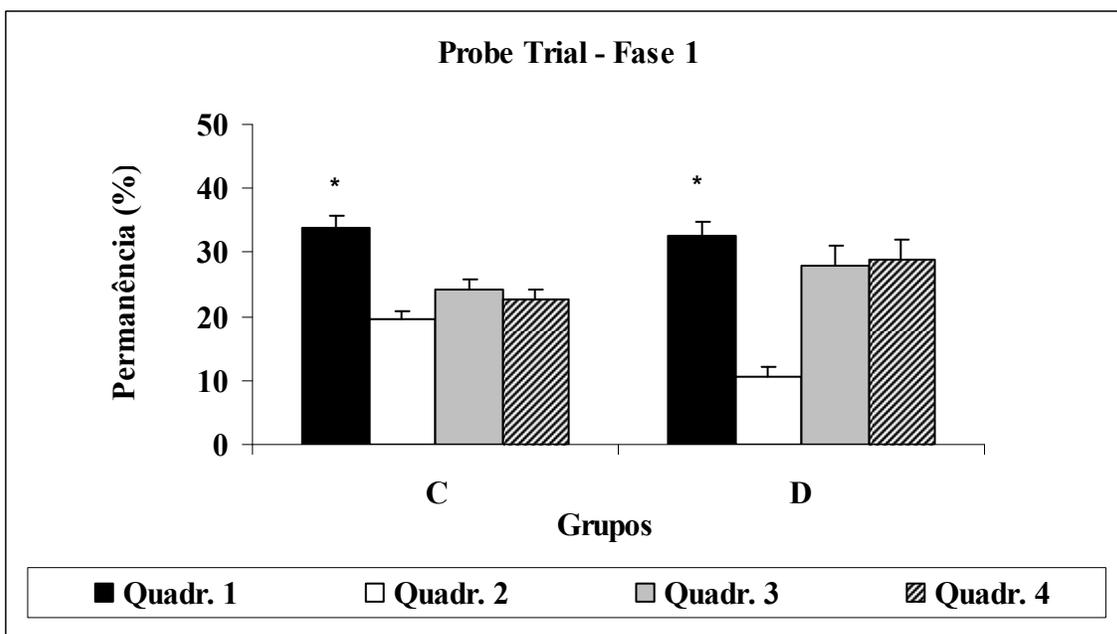
---

de alguma forma, as informações adquiridas pelos animais na primeira fase ficaram armazenadas e foram evocadas. Na Figura 10 estão representadas as latências dos animais controle e desnutridos na fase 2, e pode ser observada a diferença entre as duas fases. No entanto, a análise dos dados da fase 2 mostrou que não houve diferença significativa entre os animais desnutridos e controle. Nesta fase houve apenas efeito de tentativas [F (23, 575) = 7,09;  $p < 0,001$ ].

A *probe trial* também foi realizada novamente nos mesmos procedimentos e os resultados apresentaram um efeito significativo no fator quadrante [F (3,141) = 32,78;  $p < 0,001$ ] e na interação dos fatores dieta x fase x quadrante [F (3,141) = 2,72]. Porém, não houve efeito significativo do fator dieta, do fator fase e das interações dieta x fase, dieta x quadrante e fase x quadrante. Os animais demonstraram preferência significativamente maior pelo quadrante 1, onde a plataforma estava localizada na última sessão, em ambas as fases. Porém, na fase 2, os animais desnutridos gastaram um tempo significativamente maior no quadrante 1 comparados aos controle (Figura 12). A análise da *probe trial* somente na fase 2 também não demonstrou diferença significativa entre os animais controle e desnutridos, mas houve efeito significativo do fator quadrante [F (3,75) = 25,62;  $p < 0,001$ ] e da interação dieta x quadrante [F (3,75) = 4,30;  $p < 0,05$ ]. Este resultado pode ser considerado um bom indicativo de que os animais desnutridos aprenderam a tarefa de localizar a plataforma espacialmente, uma vez que demonstraram preferência pelo local onde ela estava localizava anteriormente.



**Figura 9** – Latência de fuga (Média ± EPM) dos animais dos grupos controle (n = 14) e desnutridos (n = 13) durante as 24 tentativas, na fase 1 (70 dias de idade).



**Figura 10** – Porcentagem de tempo despendido pelos animais dos grupos controle (n= 14) e desnutrido (n=13) nos quatro quadrantes do labirinto aquático de Morris durante a *probe trial*, na fase 1. \* p < 0,05 comparado aos outros quadrantes.

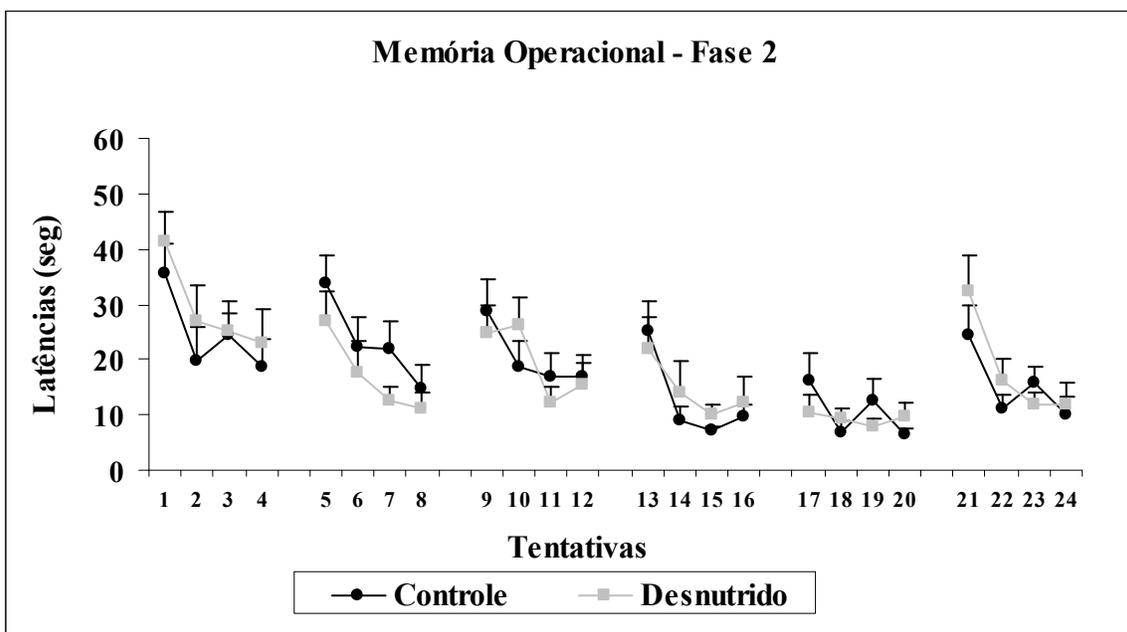


Figura 11 – Latência de fuga (Média ± EPM) dos animais dos grupos controle (n = 14) e desnutridos (n = 13) durante as 24 tentativas, na fase 2 (250 dias de idade).

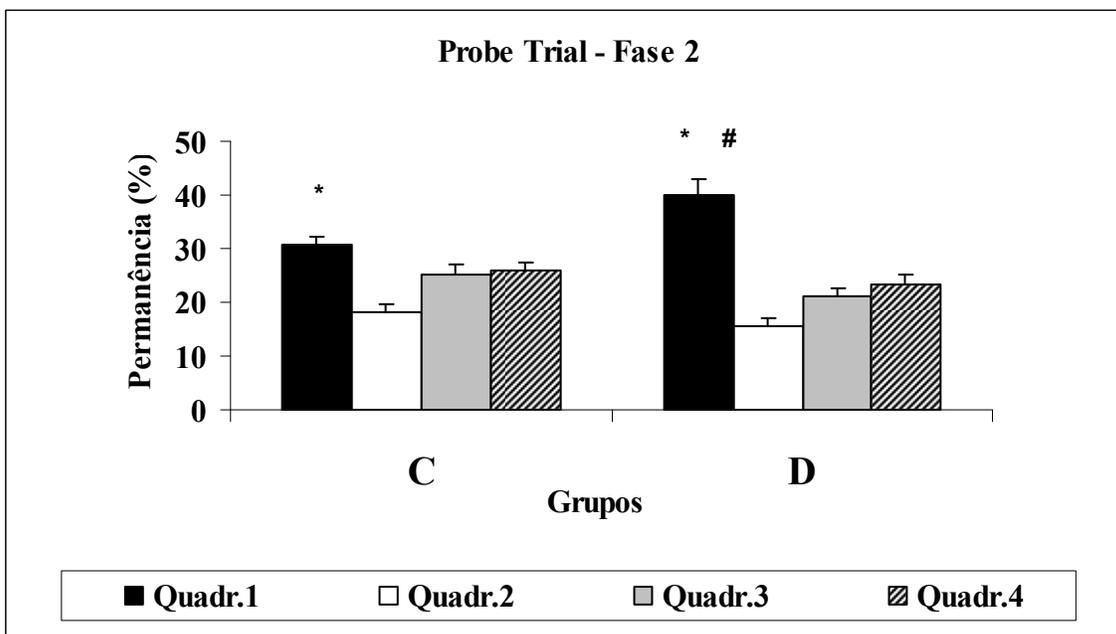
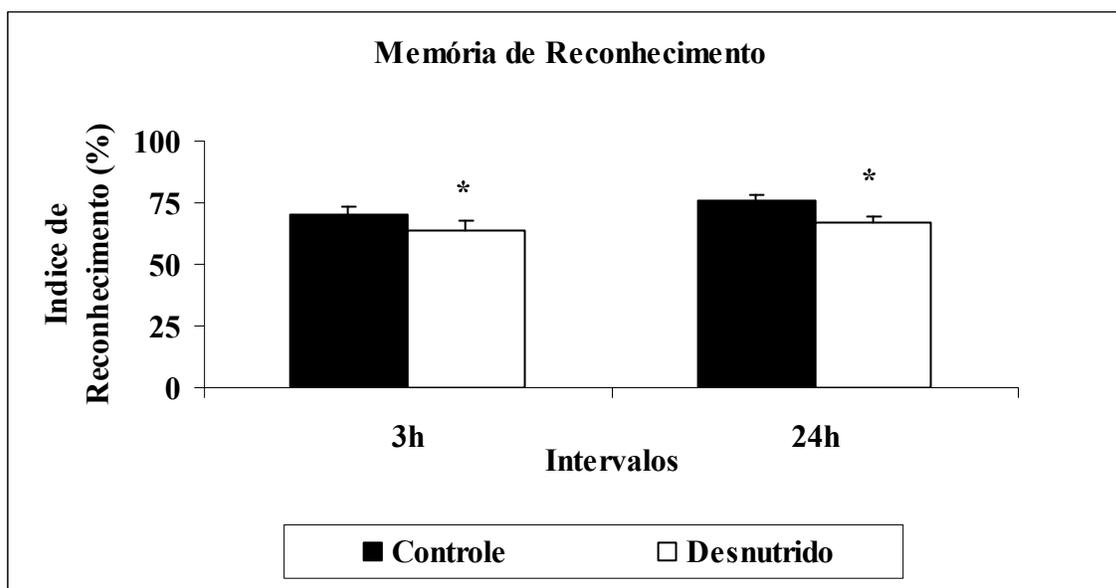


Figura 12 – Porcentagem de tempo despendido pelos animais dos grupos controle (n= 14) e desnutrido (n=13) nos quatro quadrantes do labirinto aquático de Morris durante a *probe trial*, na fase 2. \* p < 0,05 comparado aos outros quadrantes. # p < 0,05 comparado ao grupo controle na 2ª fase e aos grupos controle e desnutridos na 1ª fase.

### Medidas Comportamentais do Experimento II - Memória de reconhecimento

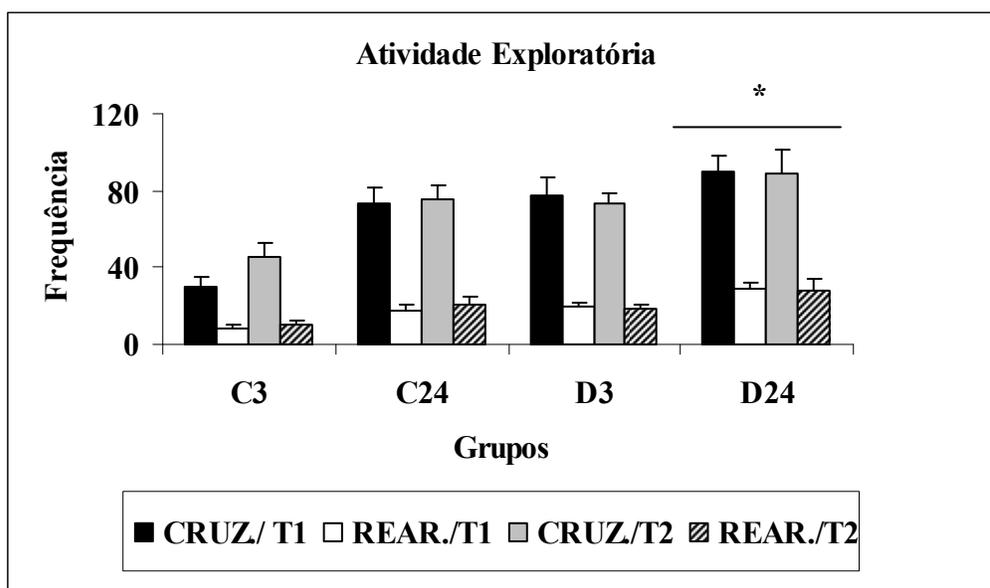
Os dados coletados neste segundo experimento para avaliação da memória de reconhecimento entre dois objetos, com três ou 24 horas de intervalo, mostraram efeito significativo do fator dieta [ $F(1,20) = 8,52; p < 0,05$ ], porém, não houve efeito significativo do fator intervalo e da interação dos fatores dieta x intervalo. Estes resultados mostram que os animais desnutridos apresentam menor reconhecimento independente do intervalo entre as tentativas de habituação e de reconhecimento (Fig. 13).



**Figura 13** - Índice de reconhecimento (Media  $\pm$  EPM) dos animais dos grupos controle (n = 12/11) e desnutrido (n = 12/11) submetidos aos intervalos inter-tentativas de 3 e de 24h. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

Com o objetivo de investigar as possíveis alterações na atividade exploratória como consequência da desnutrição protéica, foram calculadas as quantidades de quadrados cruzados e de *rearing* realizados pelos animais durante a realização da 1ª e da 2ª tentativa, nos dois tipos de intervalos. Para os cruzamentos, a ANOVA mostrou efeito significativo

do fator dieta [ $F(1,42) = 13,79$ ;  $p < 0,05$ ] e do fator intervalo [ $F(1,42) = 12,53$ ;  $p < 0,05$ ], sendo maior no intervalo de 24 horas. Para o *rearing*, os dados mostraram efeito do fator dieta [ $F(1,42) = 10,54$ ;  $p < 0,05$ ] e do fator intervalo [ $F(1,42) = 10,93$ ;  $p < 0,05$ ], também maior no intervalo de 24 h (Fig. 14), indicando que os animais desnutridos realizam este comportamento com maior frequência neste intervalo.

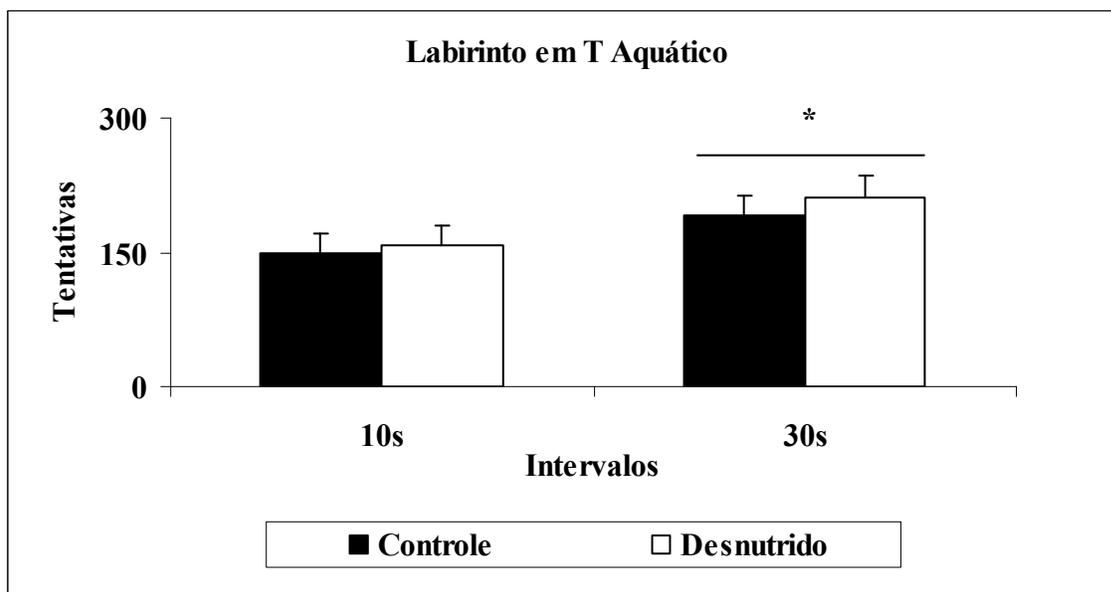


**Figura 14** – Atividade locomotora e comportamento exploratório (*rearing*) dos grupos controle e desnutrido durante a 1ª e 2ª tentativas, nos intervalos de 3 e 24h. \*  $p < 0,05$  para grupo desnutrido com 24h de intervalo comparado ao grupo controle com mesmo intervalo e para os grupos controle e desnutrido com 3h de intervalo.

### Medidas Comportamentais do Experimento III - Memória operacional no Labirinto em T Aquático

Com relação ao experimento no labirinto em T aquático, foi analisado o número total de tentativas necessárias para que animais adquirissem um nível estável de desempenho (80% de acertos em três dias consecutivos), com 10 e 30 segundos de

intervalo. Este número de tentativas foi calculado multiplicando o número de tentativas diárias (20) pelo número de dias gasto para atingirem o critério proposto. Os resultados mostram um efeito significativo somente no fator intervalo [ $F(1,43) = 53,03$ ;  $p < 0,001$ ]. Não houve diferença significativa do fator dieta e da interação dos fatores dieta x intervalo. Na Figura 15 pode ser observado que no intervalo de 30 segundos entre as tentativas forçadas e de escolhas, os animais de ambos os grupos nutricionais demoram mais para atingirem o critério proposto.



**Figura 15** – Número de tentativas (Media  $\pm$  EPM) realizadas pelos animais dos grupos controle ( $n = 12/11$ ) e desnutridos ( $n = 12/10$ ) para atingirem um nível estável de desempenho (80% de acertos em três dias consecutivos) no Labirinto em T aquático, com intervalos de 10 e 30s entre as tentativas forçada-escolha. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo submetido ao intervalo de 10s.

*Discussão*

---

## 5. DISCUSSÃO

Existem vários trabalhos na literatura relatando que a desnutrição protéica imposta em estágios iniciais da vida produz, além de alterações morfológicas e neuroquímicas no SNC, (SHOEMAKER; WURTMAN, 1973; LEWIS *et al.*, 1979; WIGGINS *et al.*, 1984; ALMEIDA, 1987; CINTRA *et al.*, 1990; GALLER *et al.*, 1995; ALMEIDA *et al.*, 1996a; MORGANE *et al.*, 2002), uma redução marcante no peso corporal e no peso encefálico (MORGANE *et al.*, 1978; DOBBING, 1987; FUKUDA *et al.*, 2002; HERNANDES; ALMEIDA, 2003; FRANÇOLIN-SILVA; ALMEIDA, 2004, VALADARES; ALMEIDA, 2005).

Os resultados encontrados no presente trabalho confirmam os resultados descritos na literatura relativos ao peso corporal, tendo em vista que tanto as ratas-mães quanto os filhotes que receberam dieta com deficiência de proteína pesaram menos durante o período de lactação.

As ratas-mães do grupo tratado com dieta deficiente em proteína apresentaram uma queda no peso corporal, mais evidente a partir da terceira semana da fase de lactação, comparadas com as ratas-mães do grupo controle, que praticamente mantiveram o mesmo peso durante toda essa fase. Esta perda de peso das mães desnutridas pode ser atribuída a um maior gasto energético na amamentação e nos cuidados com os filhotes sem a ingestão correspondente (DE OLIVEIRA, 1985). Alguns estudos mostram que as mães desnutridas passam mais tempo amamentando e menos tempo descansando fora do ninho do que as mães controle (LEVITSKY *et al.*, 1975; RIUL *et al.*, 1999), levando a um maior consumo de energia nesses animais. Outros revelaram que ratas lactantes que recebem dieta com

deficiência de proteína tendem a consumir menor quantidade de alimento (LIMA *et al.*, 1993; CAMBRAIA *et al.*, 1997; RIUL *et al.*, 1999).

Os fatores citados acima juntamente com a própria dieta deficiente em proteína, portanto, insuficiente para suprir as necessidades do animal durante a lactação, podem explicar a marcante redução de peso das ratas desnutridas.

O peso dos filhotes desnutridos durante a fase de lactação também apresentou-se diminuído em comparação ao grupo controle, ou seja, a desnutrição experimentada pelas mães afetou o peso corporal dos filhotes.

Alguns autores acreditavam que a diferença de peso entre os filhotes desnutridos e controle seria somente devido a uma redução na quantidade de leite das mães em decorrência da diminuição na produção da lactose, enquanto as concentrações de proteína e gordura estariam em níveis normais (CAMBRAIA *et al.*, 1997). No entanto, Passos *et al.* (2000) relataram que esta diferença de peso entre os filhotes se deve a uma alteração na produção, como também na composição de leite das ratas-mães desnutridas em decorrência da desnutrição. Os dados sugerem que a variação na proteína materna e o total de alimento ingerido estão associados à diminuição da síntese protéica da glândula mamária. Sendo assim, as mães estariam não apenas fornecendo menor quantidade de leite aos filhotes, mas também um leite com deficiência em proteína, provocando as alterações no crescimento e desenvolvimento desses animais.

A diferença entre o peso corporal dos animais desnutridos e controle persistiu até a fase adulta (70 dias). Mesmo após a implantação do procedimento de recuperação alimentar aos 49 dias de idade, os animais desnutridos continuaram com déficit no seu peso corporal. Portanto, a recuperação nutricional não se mostrou eficiente para a recuperação do peso

corporal dos animais desnutridos quando esses são comparados aos controles, uma vez que seus pesos nunca se igualam, mesmo após seis meses de recuperação. O fato de estes animais desnutridos nunca igualarem seus pesos e tamanhos aos do grupo controle bem nutridos, também pode ser explicado pelas alterações no desenvolvimento ósseo. Bonjour *et al.* (2001) relataram que a proteína exerce um importante papel no desenvolvimento ósseo, portanto, a baixa ingestão de proteína pode causar, em humanos e animais, prejuízos tanto na aquisição de massa óssea durante o crescimento ósseo, como também persiste até a fase adulta, aumentando o risco de osteoporose.

Passos *et al* (2000) argumentam ainda que a regulação do peso corporal do animal adulto é determinada em estágios precoces da vida (gestação e lactação); assim, o peso corporal dos adultos depende das condições nutricionais materna durante a gestação e lactação sendo a composição do leite um fator crítico no *imprinting* metabólico. A desnutrição experimentada pelas mães durante a gravidez e lactação não só é passada para os seus filhotes como também persiste até a fase adulta. O baixo peso corporal pode ser resultante da adaptação do organismo às condições precárias impostas pela desnutrição durante o seu desenvolvimento.

Segundo Morgane *et al.* (2002), a proteína não atravessa a placenta em quantidades significativas, mas é essencial para fornecer os aminoácidos para a mãe e para o feto sintetizarem proteínas. A omissão de um simples aminoácido (metionina, triptofano, lisina, etc) para o feto pode causar sérios prejuízos para o seu desenvolvimento encefálico.

Até o final do século XIX, os pesquisadores acreditavam que a estrutura cerebral permanecia constante após o nascimento, descartando a hipótese de que novas células eram adicionadas ao cérebro na fase adulta. A partir da primeira metade do século 20 começaram

a ser relatados ocasionalmente neurogênese pós-natal em mamíferos. Os pesquisadores argumentavam a existência de células indiferenciadas distribuídas pelo encéfalo, que poderiam se diferenciar tanto em neurônio como em glia. Porém, estes achados eram ignorados pelos livros e por pesquisadores tradicionais devido à inadequação dos métodos disponíveis para detectar a divisão celular e a distinção entre glia e pequenos neurônios. Entretanto, com a introdução da autoradiografia com [<sup>3</sup>H] – timidina, houve um grande avanço nestas pesquisas. Mas, só a partir dos anos 60 foram publicados os primeiros trabalhos relatando o surgimento de novos neurônios no cérebro adulto, incluindo neocórtex, bulbo olfatório e giro denteado do hipocampo. Estes neurônios foram chamados de microneurônios e considerados de suma importância para os processos de aprendizagem e memória (GROSS *et al.*, 2000).

A desnutrição protéica, além das alterações antropométricas, pode causar modificações estruturais e funcionais do SNC e, em conseqüência, produzir alterações no desenvolvimento cognitivo desse animal, como por exemplo, na cognição espacial. Estudos sugerem que os animais são capazes de adquirir informações do ambiente e representá-las no seu SNC, pela formação hipocampal, na forma de mapa cognitivo espacial. Sendo assim, os animais podem estabelecer relações espaciais entre a sua posição e a de objetos no ambiente e orientar seu deslocamento.

Existem muitos trabalhos na literatura avaliando os comportamentos que indicam aprendizagem e memória espacial em animais, utilizando diferentes aparatos, dentre os quais, estão o labirinto aquático de Morris e labirinto em T.

No presente estudo, foram utilizados o labirinto aquático de Morris, o campo aberto e o labirinto em T numa versão aquática (colocado dentro de um tanque com água).

A utilização do labirinto aquático de Morris nos estudos de aprendizagem e memória espacial em ratos vem se destacando, desde que foi descrito por Richard Morris em 1981, em diferentes aplicações na neurociência comportamental (D' HOOGE; DEYN, 2001). O desempenho dos animais no labirinto aquático pode ser influenciado por fatores como o tamanho do aparato, os procedimentos utilizados, assim como pelas características dos animais testados (sexo, idade, espécie, estado nutricional e lesões no SNC). Segundo Bedi (1992), o labirinto aquático oferece vantagens sobre os demais por não ser necessária utilização de recompensa alimentar para motivação da tarefa e privação alimentar prévia do animal. Portanto, esta seria uma das grandes vantagens de sua utilização em estudos sobre efeitos da desnutrição, uma vez que os ratos desnutridos apresentam uma maior motivação para receberem alimentos como recompensa (TONKISS; GALLER, 1990; BEDI, 1992).

No labirinto aquático, os ratos podem utilizar duas formas de navegação espacial para encontrar a plataforma: uma baseada em pistas proximais (plataforma visível) e outra baseada em pistas distais (plataforma submersa) (MORRIS, 1981; CASTRO; RUDY, 1987; FUKUDA *et al.*, 2002). A navegação utilizando pistas distais é baseada na relação entre o animal, o objeto e as pistas extralabirinto, possibilitando o uso da estratégia hipocampal de mapeamento espacial do meio ambiente, descrito por O'Keefe e Nadel (1978) para localizar a plataforma. Há estudos mostrando que animais hipocampectomizados apresentam prejuízos na tarefa baseada em "pistas distais", enfatizando a importância da formação hipocampal para esta tarefa (MORRIS, 1981; XAVIER *et al.*, 1999). Uma vez que, a desnutrição protéica pós-natal produz alterações na formação hipocampal, as tarefas que avaliam a aprendizagem e memória espacial e que, portanto, dependem da integridade desta estrutura estariam prejudicadas após um procedimento de desnutrição. Baseado nisto,

muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de investigar esses efeitos e os resultados são conflitantes. Esses conflitos podem ser explicados pelas diversos procedimentos experimentais utilizados, das espécies e das condições dos animais, assim como o tipo e fase em que a desnutrição ocorreu.

Na maioria dos trabalhos utilizando o labirinto aquático, a posição da plataforma (submersa ou visível) permanece fixa em todo o experimento e deste modo se avalia um tipo de tarefa espacial denominada *memória espacial de referência*. No entanto, o labirinto aquático também pode ser utilizado para a avaliação de um outro sistema de memória, denominado *memória espacial operacional*, na qual as informações são armazenadas por um tempo limitado em um contexto temporal específico. Para esta investigação basta mudar a posição da plataforma a cada sessão de teste. Em resumo, as informações da memória operacional são úteis para uma única tentativa, enquanto as informações da memória de referência são úteis para muitas tentativas (KESNER, 1986; OLTON, 1979). A memória operacional desempenha uma função importante na transferência das informações dos “*inputs*” sensoriais para a memória de longo prazo, estando intimamente envolvida na aprendizagem de novas informações (VAN DER LINDEN, 1998). Tanto a memória espacial de referência quanto a operacional envolve a participação da formação hipocampal no seu processamento.

Andrade e seus colaboradores vêm demonstrando desde a década passada que animais submetidos à desnutrição protéica apresentam importantes alterações hipocampais, estruturais e neuroquímicas (ANDRADE *et al.*, 1996, ANDRADE *et al.*, 1995a, ANDRADE; PAULA-BARBOSA, 1996). Estes autores demonstraram que a desnutrição, mesmo na fase adulta, causa uma grande redução na camada celular granular, no volume

das células piramidais CA1 e CA3, na densidade numérica de células granulares e no número total de células (ANDRADE *et al.*, 1995b).

Baseado nestes relatos de que a desnutrição protéica afeta vários parâmetros neuroanatômico, neuroquímicos e eletrofisiológicos da formação hipocampal e dada sua importância nos processos de aprendizagem e memória, o presente estudo buscou a investigar as possíveis influências comportamentais destas alterações.

Com relação à memória operacional no labirinto aquático de Morris, os resultados obtidos mostraram que tanto os animais controle quanto os desnutridos aprenderam a tarefa de localizar a plataforma nos diferentes quadrantes, porém, os animais desnutridos levaram um tempo maior para realizar a tarefa comparados aos controle. Este resultado sugere que houve prejuízos quanto à aprendizagem e memória operacional destes animais, no que diz respeito à utilização das informações espaciais para a realização da tarefa.

Um outro dado que deve ser levado em consideração e a primeira tentativa de cada dia, no qual os animais de ambos os grupos nutricionais apresentaram uma latência maior para encontrar a plataforma, que se encontrava em local diferente ao do dia anterior. No entanto, esse tempo diminui ao longo das tentativas, sendo mais evidente no grupo controle. Esses dados sugerem que os animais controle encontraram uma nova estratégia de navegação espacial utilizando as pistas extra-labirinto para encontrar a plataforma, enquanto os desnutridos persistiram um pouco mais na mesma estratégia de procurar a plataforma no mesmo quadrante do dia anterior, mesmo não sendo mais eficiente. Esta rigidez comportamental é característica dos animais desnutridos, que após terem aprendido uma estratégia para solucionar um problema, persistem nela por um longo período de

tempo, mesmo que sua resposta não seja mais efetiva (DE OLIVEIRA; ALMEIDA, 1985, TONKISS; GALLER, 1990).

No último dia de teste (6º dia) a latência de fuga dos animais para encontrar a plataforma chegou a diminuir cerca de 80% para os controle e de 50% para os desnutridos. Portanto, pode-se dizer que, embora os animais tenham aprendido a tarefa de encontrar a plataforma em diferentes locais, a desnutrição protéica pós-natal afetou o desempenho destes animais. Este resultado sugere que a desnutrição pode ter alterado as estruturas encefálicas responsáveis por essas funções cognitivas, como a formação hipocampal e suas conexões.

Na segunda fase do experimento (seis meses depois) foi observada uma diminuição significativa nas latências para encontrar a plataforma em ambos os grupos nutricionais, sugerindo que, de alguma forma, estes animais armazenaram as informações espaciais da tarefa durante seis meses ou então houve uma reversão dos efeitos causados pela desnutrição no SNC, durante este tempo, devido à recuperação nutricional.

Não foi encontrada diferença no desempenho entre os animais que passaram por um período de desnutrição e recuperados e os animais controle na realização da tarefa nesta fase. Isto sugere que o procedimento de recuperação nutricional, durante os seis meses após a primeira fase, foi eficiente para reverter as alterações que a desnutrição protéica possa ter causado principalmente na formação hipocampal.

Estudos comprovam que há uma correlação entre as projeções das fibras musgosas e das fibras colinérgicas hipocampais com o desempenho no labirinto aquático de Morris. Estas fibras são prejudicadas pela desnutrição protéica, mas estes prejuízos são revertidos

com o período de recuperação nutricional (LUKOYANOV; ANDRADE, 2000, ANDRADE; PAULA BARBOSA, 1996, ANDRADE *et al.* 1995a).

Estes procedimentos foram baseados nos estudos de Van Groen *et al.* (2002), no qual testaram a hipótese de que os ratos podiam reter informações das tarefas espaciais por longos períodos de tempo, independente da idade. Assim, animais com 12 meses de idade foram submetidos a uma tarefa de memória operacional no labirinto aquático de Morris e retestados 12 meses depois na mesma tarefa (24 meses de idade). Um grupo controle com 24 meses de idade, que não tinha passado pela tarefa anteriormente, foi utilizado como comparação. Os autores observaram que os ratos pré-treinados demonstraram um desempenho significativamente melhor que os animais controle e concluíram que o desempenho em tarefas espaciais para animais com maior idade depende de uma exposição prévia àquela tarefa.

Os resultados encontrados se assemelham àqueles obtidos por Roloff *et al.* (2002), que estudaram o desempenho de modelos animais de doença de Alzheimer no labirinto aquático de Morris, analisando a memória operacional num procedimento semelhante ao utilizado no presente trabalho e observaram um déficit no desempenho destes animais. Essa doença produz degenerações em regiões cerebrais compostas por uma parte do lobo temporal medial, incluindo hipocampo e amígdala, estruturas que estão relacionadas com o processamento da aprendizagem e memória.

A *probe trial* mostrou que os animais controle e desnutridos, na fase 1, permaneceram preferencialmente no quadrante 1, onde a plataforma se localizava na última sessão de treino. A preferência pelo quadrante 1 persistiu para ambos os grupos nutricionais, na fase 2, sugerindo que todos os animais aprenderam a localização da

---

plataforma espacialmente. No entanto, nesta fase, os animais desnutridos apresentaram uma preferência ainda maior pelo quadrante 1 comparados aos controle. O teste com a plataforma removida (*probe trial*) é realizado para se determinar a precisão da aprendizagem espacial do animal, representado pelo tempo gasto no quadrante onde a plataforma se localizava anteriormente, neste caso, na última sessão de treino. Esta análise é um indicativo de que o animal utilizou uma estratégia de orientação para localizar a posição da plataforma em relação às pistas visuais do ambiente (BLOKLAND *et al.*, 2004). No caso do presente estudo, a rigidez comportamental dos animais desnutridos pode ter favorecido a realização da tarefa, representada pela persistência em uma mesma estratégia espacial.

Conforme relatado anteriormente, as tarefas de aprendizagem e memória são mediadas pela formação hipocampal (MORRIS, 1981; BEDI, 1992; D'HOOGHE; DEYN, 2001; ROLOFF *et al.*, 2002). A desnutrição protéica pós-natal parece produzir significativas alterações morfológicas e neuroquímicas na formação hipocampal, uma vez que o seu desenvolvimento continua até os 35 dias de idade (GALLER *et al.*, 1995, MORGANE *et al.*, 2002). Estas alterações podem ajudar a interpretar os resultados encontrados no presente estudo e reforça a importância da realização de estudos histológicos e neuroquímicos após um procedimento de desnutrição protéica para melhor embasamento dos achados comportamentais.

Os dados com relação ao desempenho da memória de reconhecimento mostraram uma diferença significativa entre os grupos nutricionais nos intervalos de três e 24 horas entre as tentativas de habituação e reconhecimento. Os animais desnutridos exploram menos o objeto novo comparado ao grupo controle. Portanto, pode-se dizer que esses

---

animais não lembraram do objeto familiar, apresentado na tentativa anterior, independente do intervalo utilizado. Estes resultados sugerem que a desnutrição protéica afetou a memória de reconhecimento destes animais. No entanto, o fator tempo que na maioria dos testes de reconhecimento parece exercer um papel crucial no processamento das informações e formação da memória de longo prazo, não teve influência, visto que em ambos os intervalos os desnutridos demonstraram déficits.

Esses dados são semelhantes aos obtidos por Dodart *et al.* (1997) e Obinu *et al.* (2002). Dodart *et al.* (1997) avaliaram os efeitos da escopolamina (antagonista colinérgico) nas tarefas de reconhecimentos de dois objetos no campo aberto, com diferentes intervalos entre as tentativas. Os resultados mostraram que a administração de escopolamina prejudicou a memória de reconhecimento dos animais. Obinu *et al.* (2002), utilizando os mesmos procedimentos de Dodart *et al.* (1997), estudaram os efeitos de um agonista nicotínico (TC-1734) na memória de reconhecimento e observaram que os animais tratados com a droga exploraram mais o objeto novo do que o familiar comparado aos animais controle. Portanto, pode-se dizer que houve uma facilitação do sistema de transmissão colinérgica, melhorando o desempenho nesta tarefa. Estes dados confirmam a participação deste sistema de neurotransmissão no processamento da memória de reconhecimento. Outros autores também destacam a importância da participação dos neurotransmissores colinérgicos, glutamatérgico e gabaérgicos, assim como da síntese de proteína no hipocampo para a habituação a ambientes novos (VIANNA *et al.*, 2000).

Baseado nestes dados, os prejuízos na memória de reconhecimento poderiam ser explicados pelas alterações produzidas na formação hipocampal e no sistema de neurotransmissão colinérgico em consequência da desnutrição protéica pós-natal.

Segundo Dodart *et al.* (1997), a tarefa de reconhecimento de objeto parece ter utilidade nos estudos de memória de reconhecimento, como também para estudar o fenômeno de habituação a ambientes novos.

Para se investigar possíveis alterações na atividade locomotora e na exploração, a quantidade de quadrados cruzados no campo aberto e de *rearing* realizados durante os testes foram analisadas e os resultados mostraram que a desnutrição aumentou a frequência destes comportamentos, principalmente com intervalo de 24 horas entre as tentativas. Este aumento pode ser atribuído a uma menor ansiedade e/ou maior impulsividade dos animais desnutridos (ALMEIDA *et al.*, 1996b; FRANÇOLIN-SILVA; ALMEIDA, 2004), visto que estes animais parecem se arriscar mais na exploração, ou uma dificuldade na habituação em ambientes novos, podendo representar um sério risco a sua sobrevivência na natureza.

Estes dados também demonstram que a desnutrição protéica não afetou a atividade locomotora desses animais, representando um importante papel na interpretação dos dados baseados em latência para a execução de uma tarefa, fator esse que poderia interferir na conclusão deste trabalho.

Neste estudo, o fator tempo parece ter tido uma importante influência para a habituação, ou seja, quanto maior foi o tempo que separava uma tentativa da outra, menor foi a habituação dos animais desnutridos ao ambiente. Uma explicação plausível para este resultado poderia ser dada pelas dificuldades que os animais submetidos à desnutrição apresentam na retenção das informações espaciais em longo prazo.

Em contraste com os resultados no labirinto aquático de Morris, os desempenhos dos animais controle e desnutridos no labirinto em T aquático não apresentaram diferenças, isto é, o desempenho neste tipo de tarefa de avaliação da memória operacional parece não

ter sido afetado pela desnutrição protéica. No grupo submetido ao intervalo de 30 segundos todos os animais apresentaram maior dificuldade para atingir o critério proposto comparado ao grupo com 10 segundos de intervalo, porém, não houve diferença entre os grupos nutricionais.

Tarefa semelhante a utilizada no presente estudo foi realizada por Stefani e Moghaddam (2002) para avaliar os efeitos das alterações no córtex pré-frontal produzidas por drogas psicoestimulantes (anfetamina e fenciclidina) sobre a memória operacional em ratos. Os autores observaram uma alteração significativa no desempenho dos animais que receberam os psicoestimulantes, como resultado das modificações morfológicas e funcionais do córtex pré-frontal induzida por estas drogas.

Algumas explicações para os presentes resultados podem ser atribuídas a partir destes relatos. A semelhança no desempenho dos animais controle e desnutridos nesta tarefa sugere que a desnutrição protéica pós-natal possa não ter causado alterações significativas no córtex pré-frontal, ou o período de recuperação tenha sido suficiente para reverter estas alterações, uma vez que esta área parece estar envolvida no processamento da memória operacional. Alguns pesquisadores utilizaram técnicas de imagens eletrofisiológicas para identificar as áreas do cérebro envolvidas nas tarefas de memória operacional e encontraram ativações no córtex pré-frontal, pré-motor, parietal e occipital durante estas tarefas (ROOY *et al.*, 2001).

O labirinto em T é muito utilizado na avaliação da memória espacial operacional em diferentes procedimentos. No presente estudo, optou-se pela utilização deste aparato numa versão aquática para eliminar os problemas de motivação dos animais desnutridos em

receber recompensa alimentar, avaliando melhor os comportamentos que indicam aprendizagem e memória.

A divergência entre os resultados no labirinto aquático de Morris e no labirinto em T aquático pode ser explicada pela utilização das pistas distais para solucionar a tarefa espacial no experimento I fazendo uso da estratégia de mapeamento espacial, enfatizando a função da formação hipocampal, cujas alterações em decorrência da desnutrição protéica são bem descritas na literatura. Além das estruturas anteriormente mencionadas, existem relatos sobre a participação da formação hipocampal na tarefa realizada no labirinto em T aquático. No entanto, nesta tarefa os animais também utilizam estímulos proprioceptivos e pistas proximais do próprio labirinto em T para a escolha do braço correto. Isto sugere que este modelo de desnutrição não causou alterações significativas nestes sistemas ou tenham sido revertidas com a recuperação nutricional, visto que algumas destas alterações causadas pela desnutrição no SNC, sobretudo na formação hipocampal, podem ser revertidas neste período (ANDRADE *et al.* 1995a; ANDRADE; PAULA-BARBOSA, 1996; LUKOYANOV; ANDRADE, 2000).

Contudo, seria necessária a realização de medidas neuroquímicas e morfológicas nos animais experimentais, após os testes, para serem avaliados os efeitos da desnutrição no SNC e, assim, fundamentar melhor as relações entre as estruturas e os dados comportamentais de aprendizagem e memória obtidos neste estudo.

*Conclusões*

---

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos e nos resultados obtidos conclui-se que:

1. A desnutrição protéica pós-natal alterou o desempenho dos animais em tarefas de aprendizagem e memória operacional no labirinto aquático de Morris, quando testados na vida adulta (70 dias). Porém, este déficit diminuiu após um longo período, não alterando a memória a longo prazo como mostram os dados obtidos no teste seis meses depois, sugerindo que a recuperação nutricional foi eficiente para reverter as alterações produzidas pela desnutrição pós-natal.
2. A memória de reconhecimento também foi alterada pela desnutrição protéica pós-natal, independente do intervalo entre as tentativas, mostrando que os animais desnutridos reconhecem menos os objetos.
3. A atividade exploratória, quantidade de cruzamentos e *rearings*, foi alterada pela desnutrição pós-natal quando utilizado um menor intervalo intertentativas (3 horas).
4. A memória operacional testada no labirinto em T aquático não foi alterada pela desnutrição, independente do intervalo.

De maneira geral, os resultados mostram que o prejuízo na memória dos animais, em consequência da desnutrição protéica durante o período pós-natal, depende de qual tarefa está sendo executada e das estruturas encefálicas responsáveis pelo seu processamento. As tarefas que há o envolvimento direto da formação hipocampal parecem ser as mais prejudicadas, sugerindo os possíveis efeitos que este modelo de desnutrição poderia estar causando nesta região, tanto na morfologia quanto na fisiologia.

## *Referências Bibliográficas*

---

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. S. **Efeitos estruturais, bioquímicos e comportamentais da desnutrição protéica: reatividade de ratos desnutridos ao clordiazepóxido.** 1987. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ALMEIDA, S. S. *et al.* Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, n.20, p.389-402, 1996a.

ALMEIDA, S. S., TONKISS, J. & GALLER, J. R. Prenatal protein malnutrition behavior of female rats in elevated plus-maze. **Physiology Behavior**, n. 60, p. 675-680, 1996b.

ANDRADE, J.P. *et al.* Evidence of reorganization in the hippocampal mossy fiber synapse of adults rats rehabilitated after prolonged undernutrition. **Experimental Brain Research**, v.104, n.2 p. 249-261, 1995a.

ANDRADE, J.P. *et al.* Evidence of long-term malnutrition and rehabilitation on the hippocampal formation of the adult rats: a morphometric study. **Journal of Anatomy**, v. 187, n.2, p.379-393, 1995b.

ANDRADE, J.P. *et al.* The dendritic trees of the neurons from the hippocampal formation of adult protein-deprived rats. A quantitative Golgi study. **Experimental Brain Research**, v.109, p.419-433, 1996.

ANDRADE, J.P. & PAULA-BARBOSA, M. M. Protein malnutrition alters the cholinergic and GABAergic system of the hippocampal formation of the adult rats: an immunocytochemical study. **Neuroscience Letters**, v. 211, p. 211-215, 1996.

AUSTIN-LAFRANCE, R. J. *et al.* Prenatal protein malnutrition and hippocampal function: Rapid Kindling. **Brain Research Bulletin**, n.27, p. 815-818, 1991.

BADDELEY, A. D. & HITCH, G. J. Working Memory. In: \_\_\_\_ **The psychology of learning and motivation.** Edited by Bower G. Academic Press, New York, 47-90, 1974.

BADDELEY, A. D. The episodic buffer: a new component of working memory? **Trends in Cognitive Science**, v. 4, p. 417-423, 2000.

BADDELEY, A. D. Working Memory: looking back and looking forward. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 10, p. 829-839, 2003.

BARNES, R. H. *et al.* Postnatal nutritional deprivations as determinants of adult rat behavior toward food, its consumption and utilization. **Journal of Nutrition**, v. 96, p. 467-476, 1968.

BEDI, K. S. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. **Journal of Comparative Neurology**, n. 311, p. 425-433, 1991.

BEDI, K. S. Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. **Physiology & Behavior**, n.51, p. 1001-1007, 1992.

BELMAR, J. *et al.* Malnutrition early in life impairs alpha-2 adrenoceptor regulation of noradrenaline release in the rat cerebral cortex. **Nutrition Research**, v.16, n.10, p. 1727-1734, 1996.

BLOKLAND, A., GERAERTS, E. & BEEN, M. A detailed analysis of rats' spatial memory in a probe trial of a Morris tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 154, p. 71-75, 2004.

BONJOUR, J. P. *et al.* Protein intake and bone growth. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.26, p.153-166, 2001.

BURTON, B. T. Proteína e Aminoácidos. In: \_\_\_\_\_. **Nutrição Humana**, 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1979, cap. 7, p. 49-66.

BURT, A. M. O sistema límbico. In: \_\_\_\_\_. **Neuroanatomia**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1995, cap.22, p. 384-399.

CAMBRAIA, R. P. B., VANNUCCHI, H. & DE OLIVEIRA, L. M. Foods intake and weight of lactating rats maintained on different protein-calorie diets, and pup growth. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.30, p. 985-988, 1997.

CAMPBELL, L. F. & BEDI, K. S. The effects of undernutrition during early life on spatial learning. **Physiology and Behavior**, v. 45, n. 5, p. 883-890, 1989.

CASTRO, A. C. & RUDY, J. W. Early-life malnutrition selectively retards the development of distal-but not proximal-cue navigation. **Development Psychobiology**, v.20, n.5, p.521-537, 1987.

CATÂNIA, A. C. Aprendizagem e comportamento. In: \_\_\_\_\_. **Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição**. Editado por Catânia, A. C. Artes Médicas, 4<sup>a</sup> edição, São Paulo, 21-31, 1998.

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.

CÓRDOBA, N. E. *et al.* Perinatal undernutrition impairs spatial learning in recovered adult rats. **Acta Physiologica Pharmacologica Therapeutica latinoamericana**, v.44, n.3, p. 70-76, 1994.

DA SILVA HERNANDES, A. *et al.* Effects of different malnutrition techniques the behavior of rats tested in the elevated T-maze. **Behavior Brain Research**, 162, p.240-245, 2005.

DEBASSIO, W. A. *et al.* Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. **Brain Research Bulletin**, v. 35, n. 1, p. 57-61, 1994.

DEBASSIO, W. A. *et al.* Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. **Brain Research Bulletin**, v. 41, n. 6, p. 379-83, 1996.

D'HOOGE, R. & DE DEYN, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews**, v. 36, p. 60-90, 2001.

DE OLIVEIRA, L. M. Malnutrition and environment: interaction effects upon animal behavior. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 13, n. 2, p. 99-106, 1985.

DE OLIVEIRA, L. M. & ALMEIDA, S. S. Effects of malnutrition and environment on the acquisition and the extinction of avoidance behavior in rats. **Physiology and Behavior**, v. 34, p. 141-154, 1985.

DÍAZ-CINTRA, S. *et al.* Effects of prenatal protein deprivation on the postnatal development of granule cells in the fascia dentata. **The Journal of Comparative Neurology**, n.310, p. 356-364, 1991.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: Davidson, N. A. & Dobbing, J. (Eds). **Applied Neurochemistry**. Oxford Blackwell Scientific Publications, Ltd., 1968, p.287-316.

DOBBING, J. **Early nutrition and later achievement**. London, UK: Academic Press, 1987.

DODART, J.C.; MATHIS, C. & UNGERER, A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. **Neuroreport**, v.8, p. 1173-1178, 1997.

FRANÇOLIN-SILVA, A. L. & ALMEIDA, S. S. The interaction of housing condition and acute immobilization stress on the elevated plus-maze behaviors of protein-malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1035-1042, 2004.

FUKUDA, M. T. F.; FRANÇOLIN-SILVA, A. L. & ALMEIDA, S. S. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris Water Maze. **Behavioural Brain Research**, v. 133, p. 271-277, 2002.

GALLER, J. R.; SHUMSKY, J. S. & MORGANE P. J. (1995) Malnutrition and brain development. **Nutrition in Pediatrics**, 2<sup>a</sup> edition, cap.14, p.1-55.

GARCÍA-MORENO, L. M. *et al.* Chronic ethanol intake and object recognition in young and adult rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p.831-837, 2002.

GOODLET, C. R. *et al.*. Spatial cue utilization in chronically malnourished rats: task-specific learning deficits. **Developmental Psychobiology**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 1986.

GROSS, C.G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. **Nature**, n.109, v. 1, p. 67-73 , 2000.

HALL, R. D. Is Hippocampal function in the adult rat impaired by early protein or protein-calorie deficiencies? **Developmental Psychobiology**, v.16, n.5, p.395-411, 1983.

HERNANDES, A. S. & ALMEIDA, S.S. Postnatal protein malnutrition affects inhibitory avoidance and risk assessment behaviors in two models of anxiety in rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 213-219, 2003.

IZQUIERDO, I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB Journal**, v. 8, p. 1139-1145, 1994

IZQUIERDO, I & MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural Pharmacology**, v. 11, n. 7-8, p. 517-534, 2000.

JORDAN, T. C., CANE, S. E. & HOWELLS, K. F. Deficits in spatial memory performance induced by early undernutrition. **Developmental Psychobiology**, v. 14, n. 4, p. 317-325, 1981.

KESNER, R.P. Neurobiological Views of Memory. In: \_\_\_\_\_ **Learning and Memory. A Biological View**, edited by Joe L. Marinez Jr. and Raymond P. Kesner. Academic Press, San Diego, p.399-438, 1986.

KESSELS, R. P. C. *et al.* Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. **Brain Research Reviews**, v. 35, p. 295-303, 2001.

LAMBERTY, Y. & GOWER A. J. Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a morris-type water maze. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 309, p. 5-19, January-February 1991.

LEVITSKY , D. A., MASSARO, T. F. & BARNES, R. H. Maternal malnutrition and neonatal environment. **Federation Proceedings**. v. 34, p. 1583-1586, 1975.

LEWIS, P. D.; PATEL, A. J. & BALÁZS R. Effects of undernutrition on cell generation in the rat hippocampus. **Brain Research**, v. 168, p. 186-189, 1979.

LIMA, J. D. *et al.* Comparison of the effects of lab chow and casein diets based on body and brain development of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 26, p. 1069-1076, 1993.

LUKOYANOV, N. V. & ANDRADE, J. P. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adults rats: relevance to morfological alterations in the hippocampal formation. **Behavioral Brain Research**, n.112, p. 85-97, 2000.

LUKOYANOV, N. V. *et al.* Restricted feeding facilitates time-place learning in adult rats. **Behavioural Brain research**, v.134, p.283-290, 2002.

MCGAUGH, J. L. Dissociating learning and performance: Drug and hormone enhancement of memory storage. **Brain Research Bulletin**, v. 23, p.339-345, 1989.

MORGANE, P. J. *et al.* Malnutrition and the developing central nervous system. In.: \_\_\_\_\_. **The Vulnerable Brain Environmental Risks**, v.1: malnutrition and Hazard Assessment, edited by Robert I. Isaacson and Karl F. Jensen. Plenum Press, New York, 1992

MORGANE, P.J. *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, n.17, p. 91-128, 1993.

MORGANE, P. J. , MOKLER, D. J. & GALLER, J. R. Effects of protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience Biobehavioural Review**, v. 26, n. 4, p. 471-83, 2002.

MORRIS, R. G. M. Spatial localization does not require the presence of local cues, **Learning and Motivation**, v. 12, p. 239-260, 1981.

MORRIS, R.G.M. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, n. 11, v. 1, p. 47-60, 1984

OBINU, M. C. *et al.* Brain-selective stimulation of nicotinic receptors by TC-1734 enhances Ach transmission from frontoparietal cortex and memory in rodents. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 913-918, 2002.

O'KEEFE, J. B. & NADEL, R. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford England. Clarendon, 1978.

OLTON, D. S. & PARAS, B. C. Spatial memory and hippocampal function. **Neuropsychologia**, v.17, n. 6, p.669-682, 1978.

OLTON, D. S. Mazes, maps and memory. **American Psychology**, v.35, n.7, p.583-596, 1979.

PASSOS, M. C. F. *et al.* Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, v. 11, n. 20, p. 1603-1612, 2000.

PONZO, O. J. *et al.* A proteic diet decreases hypothalamic catecholamine turnover in adult male rats. **Brain Research**, n.871, p. 44-49, 2000.

POTHUIZEN, H. H. J. *et al.* Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 705-712, 2004.

QUIRK, G. J. *et al.* Early malnutrition followed by nutrition restoration lowers the conduction, velocity and excitability of the corticospinal tract. **Brain Research**, v.670, p.277-283, 1995.

RIUL, T. R. *et al.* Ethological analysis of mother-pup interactions and other behavioral reactions in rats: effects of malnutrition and tactile stimulation of the pups. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 32, p. 91-97, 1999.

ROCINHOLI, L. F.; ALMEIDA, S. S. & DE OLIVEIRA, L.M. Response threshold to aversive stimuli in stimulated early-protein malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p.407-413, 1997.

ROLOFF, E. V. L.; PLATT, B. & RIEDEL, G. No spatial working memory deficit in  $\beta$ -amyloid-exposed rats. A longitudinal study. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.26, p.955-970, 2002.

ROOY C. V. *et al.* Spatial working memory and intelligence biological correlates. **Intelligence**. V. 29, p. 275-292, 2001.

SANTUCCI, L. B. *et al.* Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, p.393-398, 1994.

SCHÜRCH, B. Malnutrition and behavioral development: The nutrition variable. **Journal of Nutrition**, n.125, p.2255s-2262s, 1995.

SEELEY, R. J., GRILL, H. J. & KAPLAN, J. M. Neurological dissociation of gastrointestinal and metabolic contributions to meal size control. **Behavioral Neuroscience**, n. 108, p. 347-352, 1994.

SHOEMAKER, W. J. & WURTMAN, R. J. Effect of perinatal undernutrition on the metabolism of catecholamines in the rat brain. **Journal of Nutrition**, n.103, p.1537-1547, 1973.

SMART, J. L. & DOBBING, J. Increased thirst and hunger in adult rats undernourished as infants: an alternative explanation. **Brazilian Journal of Nutrition**, n. 37, p. 421-430, 1977.

STEFANI, M. R. & MOGHADDAM, B. Effects of repeated treatment with amphetamine or phencyclidine on working memory in the rat. **Behavioural Brain Research**, v.134, p.267-274, 2002.

STRUPP, B. J. & LEVITISKI, A. D. Enduring cognitive effects of early Malnutrition A theoretical reappraisal. **Journal of Nutrition**, n.125, p.2221s-2229s, 1995.

TOMAZ, C. Amnésia. In \_\_\_\_\_. **Neurobiologia da Doenças Mentais**, v. 1: Editado por Frederico Guilherme Graeff, Marcus Lira Brandão. 5ª edição, Lemos, São Paulo, 1999:

TONKISS, J. & GALLER, J. R. Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adults rats. **Behavioural Brain Research**, v. 40, p. 95-107, 1990.

TONKISS, J., SHULTZ, P. & GALLER, J. R. (1994) An analysis of spatial navigation in prenatally protein malnourished rats. **Physiology and Behavior**, n. 55, p. 217-224, 1994.

TONKISS, J. *et al.* Prenatally protein-malnourished rats are less sensitive to the amnesic effects of medial septal infusions of chlodiazepoxide. **Behavioural Pharmacology**, v. 11, n. 6, p.437-446, 2000.

TRUSWELL, A. S. Protein versus energy in protein energy malnutrition. **South African Medical Journal**, v. 59, p. 753-756, 1981.

VALADARES, C. T. & ALMEIDA, S.S. Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water maze. **Nutritional Neuroscience**, v. 8 n.1, p. 39-47, 2005.

VAN DER LINDEN, M. The relationships between working memory and long-term memory. **Life Sciences**, v. 321, p. 175-177, 1998.

VAN GROEN, T.; KADISH, I. & WYSS J. M. Old rats remember old tricks; memories of the water maze persist for 12 months. **Behavioural Brain Research**, v.136, p. 247-255, 2002.

VIANNA *et al.* Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. **Learning and Memory**, v. 7, p. 333-340, 2000.

WATERLOW, J. C. Kwashiorkor revisited: the pathogenesis of edema in kwashiorkor and its significance. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 436-441, 1984.

WIGGINS, R.C. *et al.* Undernutrition and the development of brain neurotransmitter system. **Life Science**, n.35, p.2085-2094, 1984.

WOLF, C. *et al.* Behavioral effects of severe and moderate malnutrition. **Physiology and Behavior**, v.38, p.725-730, 1986.

XAVIER, G. F., OLIVEIRA-FILHO, F. J. B & SANTOS, A. M. G. Dentate gyrus-selective colchicine and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in “place strategy” because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? **Hippocampus**, v. 9, p.668-681, 1999.

YOUNG, P.A. & YOUNG, P.H. O sistema límbico: amnésia anterógrada e comportamento inadequado. In.: \_\_\_\_\_. **Bases da Neuroanatomia Clínica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998.

ZHANG, W. N. *et al.* Dissociation of function within the hippocampus: effects of dorsal, ventral and complete excitotoxic hippocampal lesions on spatial navigation. **Neuroscience**, v. 127, p. 289-300, 2004.

*Anexos*

---

**Efeitos da desnutrição protéica pós-natal no desempenho de ratos em tarefas de aprendizagem e memória.**

*Effects of postnatal protein malnutrition on the performance of rats in learning and memory tasks.*

Camila Tavares Valadares e Sebastião de Sousa Almeida\*

Laboratório de Nutrição e Comportamento, FFCLRP, Universidade de São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brasil.

**Termos de indexação:** Desnutrição protéica, aprendizagem, memória operacional, memória de reconhecimento.

**Indexing terms:** Protein malnutrition, learning, working memory, recognition memory.

**Short-title:**

Desnutrição, aprendizagem e memória.

Malnutrition, learning and memory.

\* **Corresponding author:** Fax: +55 16 6355668. E-mail: [sebasalm@usp.br](mailto:sebasalm@usp.br)

## **RESUMO**

### **Objetivos**

Investigar os efeitos da desnutrição protéica pós-natal em diferentes tarefas de aprendizagem e memória.

### **Métodos**

Ratos Wistar tratados com dietas contendo 6% (desnutrido) ou 16% (controle) de proteína do nascimento até 49 dias foram testados em três experimentos: memória operacional no labirinto aquático de Morris (experimento I) aos 70 dias (fase 1) e após seis meses (fase 2); memória de reconhecimento de objetos no campo aberto (experimento II) com dois tipos de intervalos (3 e 24 horas) entre as tentativas de habituação e reconhecimento e memória operacional no labirinto em T aquático (experimento III) com dois tipos de intervalos entre tentativas (10 e 30 segundos).

### **Resultados**

A latência de fuga dos animais desnutridos no experimento I foi significativamente maior que a dos controle. Na fase 2 esta diferença entre os grupos nutricionais desapareceu. No experimento II, os índices de reconhecimento dos animais desnutridos foram significativamente maiores que dos controle tanto no intervalo de 3h como no intervalo de 24h. No experimento III houve diferença apenas no tipo de intervalo, sendo que no intervalo de 30s todos os animais demoraram mais para atingirem o critério proposto.

### **Conclusão**

A desnutrição protéica pós-natal causou prejuízos sobre a memória operacional no labirinto aquático de Morris, porém, este déficit diminuiu após um longo período como mostram os dados obtidos no teste seis meses depois, sugerindo que a recuperação nutricional foi eficiente para reverter às alterações produzidas pela desnutrição. A tarefa de memória operacional no labirinto em T aquático não foi afetada por este modelo de desnutrição, independente do intervalo. No entanto, a tarefa de memória de reconhecimento foi prejudicada pela desnutrição pós-natal, independente do intervalo, mostrando que os animais desnutridos reconhecem menos os objetos.

## **ABSTRACT**

### **Objectives**

The aim was to investigate the effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory tasks.

### **Methods**

Wistar rats fed on diets containing 6% (malnourished) or 16% (control) of protein from birth to 49 days of age were tested in three experiments: working memory tasks in the Morris water maze (experiment I) at 70 days of age (phase 1) and six months later (phase 2), recognition memory of objects in the open field (experiment II) with two types of intervals (3 and 24) between the trials, and working memory in the water T-maze (experiment III) with two types of intervals between trials (10 and 30 s).

### **Results**

Escape latency in malnourished animals in experiment I was significantly higher than escape latency in controls. On phase 2, this difference disappeared. In experiment II, recognition indexes of malnourished groups were significantly higher in both 3-h and 24-h intervals. In experiment III, there was a difference only in the type of interval, as the animals took longer to achieve the criteria in the 30-s interval.

### **Conclusion**

Protein malnutrition caused impairments on the working memory in the Morris water maze, but these deficits disappeared after nutritional recovery. Recognition memory was impaired by postnatal malnutrition independently of the type of interval. Working memory in the water T-maze was not affected by postnatal protein malnutrition.

## INTRODUÇÃO

A desnutrição é um problema de saúde causada principalmente pela ingestão de alimentos em quantidades insuficientes para o desenvolvimento e funcionamento ótimo do organismo, podendo ocorrer também por falta ou insuficiência de nutrientes, por deficiências nos processos de transformação dos alimentos, na fase de absorção ou mesmo na utilização destes nutrientes pelo organismo. Sua origem é multifatorial e comumente está relacionado com baixo padrão social e econômico, como também por outros fatores relacionados à produção, armazenamento, industrialização, distribuição e custo dos próprios alimentos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a desnutrição está entre os maiores perigos à saúde. Reconhece-se que cerca de 55% das mortes infantis em países pobres, estão associadas à desnutrição (<http://www.aleitamento.org.br>).

Muitas vezes a desnutrição é associada às imagens de televisão feitas na África, onde uma legião de esqueléticos espera que órgãos internacionais enviem a próxima refeição. Este tipo de desnutrição é conhecido por marasmo, caracterizado pela perda de tecido muscular e adiposo, reduzindo cerca de 60% do peso corporal esperado pela idade<sup>1</sup>. No Brasil, esse tipo de desnutrição é muito difícil de ser encontrada. Por aqui é mais comum a desnutrição do tipo *Kwashiorkor*, palavra importada da África, que significa “primeira criança-segunda criança” e vem da observação de que a primeira criança desenvolve *Kwashiorkor* quando a segunda criança nasce e a substitui no peito da mãe.

O estado nutricional é uma condição importante no desenvolvimento e organização funcional do Sistema Nervoso Central (SNC), estando diretamente relacionado com a produção de energia e de nutrientes necessários ao desenvolvimento de estruturas celulares e dos vários sistemas metabólicos<sup>2</sup>. O processo de maturação do SNC e o bom

desenvolvimento da capacidade mental dependem de três fatores: genética do indivíduo, estimulação ambiental e nutrientes disponíveis<sup>3</sup>.

Existem inúmeros trabalhos na literatura demonstrando que a desnutrição protéica, imposta em fases precoces da vida, causa prejuízos no desenvolvimento cerebral, alterando parâmetros neuroanatômicos, neuroquímicos, fisiológicos e funcionais<sup>2,3,4,5,6,7,8,9</sup>. Embora alguns dos efeitos da desnutrição protéica sobre o comportamento estejam bem estabelecidos<sup>4</sup>, o desempenho de animais desnutridos em tarefas que avaliam aprendizagem ainda é bastante controverso. Dentre os tipos de aprendizagem, a espacial vem sendo muito investigada usando diferentes procedimentos, tais como o labirinto radial<sup>10</sup>, alternância espacial<sup>10</sup> e tarefa de navegação espacial<sup>11,12,13</sup>. O interesse na aprendizagem espacial pode ser justificado pelos resultados encontrados na literatura mostrando que a desnutrição protéica afeta a morfologia<sup>14</sup>, neuroquímica<sup>5</sup> e neurofisiologia<sup>15</sup> da formação hipocampal, no qual acredita-se que esteja envolvida em funções como aprendizagem e memória, principalmente a espacial<sup>16</sup>.

O'Keefe e Nadel<sup>16</sup> relataram que o hipocampo atua na aprendizagem e armazenamento da representação do ambiente espacial codificando-o em mapas cognitivos. Este conceito de mapa cognitivo refere-se ao estabelecimento de representações de pistas associadas a um local e das posições relativas a estes locais, capacitando o organismo a utilizar estas representações. Esta teoria sustenta que os animais podem aprender sobre as relações espaciais de objetos e relaciona estes eventos com o contexto espacial em que ocorre. Estes mesmos autores relatam, ainda, a existência de um outro sistema de localização espacial denominado de “sistema de taxon”, no qual não dependeria da formação hipocampal.

Vários estudos vêm mostrando que os déficits na aprendizagem e memória espacial estão correlacionados com alterações fisiológicas e/ou neuroanatômicas da formação hipocampal, principalmente nas áreas CA1, CA3 e CA4<sup>3,6,7,8</sup> como também, as alterações nas células granulares do giro denteado em animais que foram desnutridos na fase pré e pós-natal<sup>5</sup>. Outros estudos mostraram que ratos desnutridos apresentam alterações degenerativas na arborização hipocampal<sup>17</sup>, mudanças no sistema colinérgico e GABAérgico, como também uma importante diminuição na rede de fibras colinérgicas hipocampais após 12 meses de privação de proteína<sup>18</sup>. Estudos mostram a participação do sistema de neurotransmissão GABAérgico nos processos de aprendizagem e memória espacial<sup>19</sup> como também a participação do sistema colinérgico<sup>20</sup>.

Além destas alterações morfológicas e neuroquímicas, ocorrem também importantes alterações eletrofisiológicas, como por exemplo, na plasticidade sináptica<sup>3</sup>. Estas alterações podem fornecer informações de como o insulto nutricional pode afetar o desenvolvimento cerebral em relação aos prejuízos na atenção, aprendizagem e memória<sup>6</sup>. Os principais tipos de alterações sinápticas encontradas estão relacionadas com LTP (Potenciação de Longa Duração) e o *kindling*.

Importantes estudos comportamentais vêm sendo realizados com o objetivo de investigar os efeitos da desnutrição precoce na aprendizagem e memória espacial em ratos<sup>10,11,12,13</sup> e os resultados obtidos são conflitantes. Isto se deve a grande variedade nos modelos utilizados para produzir a desnutrição ou para testar o comportamento dos animais.

A aprendizagem e memória espacial são processos imprescindíveis à sobrevivência do organismo em certas condições ambientais. Portanto, a memória não pode ser definida de maneira simples, como se fosse a simples recordação ou lembrança de eventos que

ocorreram no passado. Trata-se de processos complexos que envolvem inúmeros fatores anatômicos, fisiológicos, neuroquímicos, comportamentais e ambientais. De modo geral, podemos definir memória como sendo um processo que envolve a capacidade dos animais de aquisição, armazenamento e evocação das informações. Outros autores definem a memória como sendo a capacidade de alterar o comportamento em função de experiências anteriores, definição essa que também pode ser atribuída à aprendizagem.

Olton & Paras<sup>21</sup> consideram dois tipos de memórias que organizam as informações. As informações apresentadas em contextos temporais específicos são organizadas sob a forma de *memória operacional*, sendo mantidas por curtos períodos de tempo. Entretanto, as informações que independem do contexto específico, segundo esses autores, são organizadas sob a forma de *memória de referência* e podem ser arquivadas por diferentes intervalos de tempo, ou até mesmo por toda a vida do indivíduo.

Com relação à memória espacial de referência e operacional, inúmeros estudos vêm sendo realizados e o labirinto aquático de Morris é um aparato muito utilizado.

Vários estudos mostram que animais mantidos em condições ideais são capazes de aprender a localizar a plataforma utilizando as pistas espaciais presentes no local (distais ou proximais). No entanto, animais que foram expostos a algum procedimento que possa ter resultado em alterações no SNC, como a desnutrição protéica precoce, apresentam déficits na tarefa de localizar a plataforma espacialmente<sup>11,12,13</sup>.

A memória espacial operacional também vem sendo estudada no labirinto aquático de Morris, com a plataforma oculta sendo mudada de lugar a cada sessão. Esta é uma tarefa de relativa dificuldade para os animais, uma vez que as informações utilizadas para localizar a plataforma em um determinado momento, podem não ser mais eficiente em um

outro. Esta tarefa é muito utilizada pelos pesquisadores nas pesquisas sobre os efeitos de diversas desordens neurológicas sobre a memória<sup>22,23</sup>.

Além do labirinto aquático de Morris, o labirinto em T também é utilizado para avaliar a memória operacional. Nas pesquisas dos efeitos de estimulantes psicomotores sobre a memória operacional, Stefani & Moghaddam<sup>24</sup> utilizaram a tarefa de alternância com tentativas-pariadas no labirinto em T. Nestes experimentos geralmente são utilizadas recompensas alimentares como reforço às escolhas corretas. Para isso, os animais terão que passar por um procedimento de privação antes dos testes. No caso dos experimentos para se avaliar os efeitos da desnutrição sobre a memória não se deve utilizar recompensa alimentar para reforçar os animais devido a maior motivação dos animais desnutridos para receber alimentos como recompensa do que ratos controle não submetidos à desnutrição. Sendo assim, o labirinto em T aquático seria mais apropriado para esta investigação, uma vez que ele é colocado em um tanque preenchido por água e uma plataforma é colocada em um dos braços do labirinto, onde o animal poderá subir para fugir da água fria, que funciona como um estímulo aversivo.

Além da memória espacial de referência e operacional, a formação hipocampal também participa no processamento da *memória de reconhecimento*, que vem sendo estudada através da *tarefa de reconhecimento de objetos*. Esta tarefa é muito usada em humanos para se caracterizar síndromes amnésicas, testando a memória operacional não-espacial<sup>25</sup>. O reconhecimento de objetos pode ser atribuído à preferência que os ratos demonstram em explorar mais os objetos novos do que os objetos já familiares<sup>26</sup>. Os estudos mostram que os ratos normais gastam mais tempo explorando o objeto novo<sup>24,25,26</sup>.

Os prejuízos da memória de reconhecimento de objetos produzidos por alterações farmacológicas no sistema de neurotransmissão colinérgico foram estudados por Dodart *et*

*al.*<sup>25</sup>, mostrando que o desempenho nesta tarefa de reconhecimento requer a integridade do sistema colinérgico central.

Na literatura existem muitos trabalhos realizados para se investigar as alterações na memória operacional e na memória de reconhecimento decorrente de diversos procedimentos (farmacológicos e morfológicos), porém, não há estudos investigando os efeitos de um mesmo modelo de desnutrição em diferentes tarefas de aprendizagem e memória. Assim, os objetivos do presente estudo foram de avaliar os efeitos da desnutrição protéica pós-natal sobre os processos de aprendizagem e memória espacial operacional e sobre a memória de reconhecimento.

## **MÉTODOS**

### **Animais**

Foram utilizados 118 ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram recebidos no dia do nascimento e transportados ao Biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento, onde ficaram até os períodos de testes. Cada ninhada foi composta pela rata-mãe com seis filhotes machos e duas fêmeas. Durante a fase de lactação (0 a 21 dias de idade) as ninhadas foram alojadas em gaiolas de polipropileno (41 x 40 x 17 cm) e designadas aleatoriamente para receberem dietas balanceadas de 16% (grupo controle) ou 6% de proteína (grupo desnutrido). Aos vinte e um dias os animais de ambos os grupos foram desmamados, as fêmeas foram descartadas e os machos colocados em gaiolas individuais de polipropileno e alimentados com as mesmas dietas da fase de lactação até os 49 dias. As duas dietas são isocalóricas e preparadas de acordo American Institute of Nutrition (AIN,1993). A dieta hipoprotéica continha 6% de proteína (caseína), 5 % de

mistura salina, 1% de mistura vitamínica, 8% de gordura, 0,2% de colina e 79,788% de amido de milho. A dieta normoprotéica continha 16% de proteína (caseína), 69,768% de amido de milho e os outros constituintes com as mesmas porcentagens da dieta hipoprotéica. Ambas as dietas foram suplementadas com L-metionina em 2,0 g/Kg de proteína, uma vez que a caseína é deficiente desse aminoácido. A partir dos 49 dias de idade os animais de ambas as condições nutricionais (controle e desnutridos) passaram a receber ração comercial do laboratório NUVILAB – CR 1 (Nuvital Nutrientes Ltda. – Colombo, Paraná), contendo 22% de proteína, até os 70 dias de idade, quando começaram os experimentos. Os animais foram pesados semanalmente, durante a fase de lactação (0, 7, 14 e 21 dias) e pós-lactação (28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias).

## **Procedimentos**

### **Experimento I**

Foi utilizado um labirinto aquático semelhante ao utilizado por Morris<sup>29</sup>. O labirinto aquático consiste em um tanque circular (150cm de diâmetro e 39cm de altura), preenchido com água a uma temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Para tornar a água opaca foi adicionado 2L de leite. O labirinto aquático foi dividido em quatro quadrantes imaginários, numerados em sentido horário (quadrante 1, quadrante 2, quadrante 3 e quadrante 4). Uma plataforma circular (12cm de diâmetro e 25cm de altura) foi colocada 1,5 cm abaixo da superfície da água, no centro de um dos quadrantes. A posição da plataforma foi mudada a cada dia de maneira randomizada, testando a memória operacional desses animais. O labirinto aquático estava situado no centro de uma sala ampla sobre um estrado de madeira a 8cm acima do chão. Nas paredes da sala estavam fixadas pistas visuais como figuras, os armários e as portas presentes na sala também serviram de pistas que ajudaram no aprendizado da

navegação dos ratos. Uma câmera de vídeo (AS-3 Tracker, San Diego-USA) estava fixada acima do labirinto aquático e registrou todo o experimento para análise posterior. Os animais controle (n=14) e desnutridos (n=13) foram treinados no labirinto aquático de Morris com uma sessão diária contendo quatro tentativas. Os treinos de aquisição da tarefa foram realizados em seis dias, totalizando 24 tentativas ao final desta fase. Cada animal tinha 60 segundos para encontrar a plataforma, em cada tentativa. Quando o animal encontrava a plataforma permanecia no local por um intervalo de 15 segundos, quando não, era colocado sobre a plataforma pelo experimentador e permanecia ali por 35 segundos. Ao término de cada sessão diária, após secagem, os animais retornavam para suas gaiolas e só eram testados novamente no dia seguinte. Imediatamente após o término da última tentativa (6º dia) foi realizada a *probe trial*, onde a plataforma foi removida do labirinto aquático e animal tinha 60 segundos de natação livre. Após seis meses da realização da primeira fase, os animais foram submetidos a uma fase de “reteste” (fase 2) com os mesmos procedimentos da fase anterior, para a avaliação da memória a longo prazo dos animais controle e desnutridos.

## **Experimento II**

Neste experimento, os animais controle (n=23) e desnutridos (n=23) passaram por um procedimento de reconhecimento de dois objetos para avaliação da memória de reconhecimento, com dois tipos de intervalos (3 e 24 horas) entre as tentativas. O aparato utilizado foi um campo aberto feito de madeira (60 x 60 x 30 cm). Os objetos utilizados para o reconhecimento foram uma bolinha de gude (objeto A) e uma pedra de dominó de plástico (objeto B). Esses objetos, após cada tentativa, foram imersos em álcool (50%) para eliminar pistas olfatórias, assim como o campo aberto que foi limpo com um algodão embebido em álcool<sup>26</sup>. Inicialmente, os animais foram expostos ao campo aberto vazio, sem

qualquer objeto, durante três dias por um período de 15 minutos por dia. No 4º dia iniciaram-se os testes de reconhecimento, colocando o animal no campo aberto (1ª tentativa - habituação) na presença de um objeto denominado “Objeto A”, durante 10 minutos. Após esta tentativa de habituação o animal foi submetido a uma 2ª tentativa (tentativa de reconhecimento), na qual o animal foi novamente exposto ao campo aberto por 10 minutos na presença de dois objetos: o Objeto A (familiar) e um novo objeto denominado “Objeto B”. Foram utilizados diferentes intervalos intertentativas (3 e 24h) em grupos independentes de animais. O experimento foi registrado por uma câmera de vídeo localizada acima da caixa, para analisar o tempo que cada animal gastou explorando o objeto A (Tempo A) e o objeto B (Tempo B) na 2ª tentativa. Com os tempos registrados foram calculados os índices de reconhecimento (IR) para cada animal, expressado por uma razão ( $\text{Tempo B} \times 100 / \text{Tempo A} + \text{Tempo B}$ ). Foram considerados satisfatórios os IRs com valores maiores de 50% (Tempo B maior que o Tempo A).

### **Experimento III**

Neste experimento também foi avaliada a memória operacional dos animais controle (n=23) e desnutridos (n=22), utilizando a tarefa de alternância forçada no labirinto em T aquático. A tarefa foi avaliada em diferentes tipos de intervalos (10 e 30 segundos). O labirinto em T Aquático é semelhante ao convencional (madeira), contendo uma passagem principal de 65 cm de comprimento 45 cm de altura e 13 cm de largura, conectada a dois braços (alvos) com 65 cm de comprimento, 45 cm de altura e 13 cm de largura. Uma porta de 45 cm de altura e 13 cm de largura era operada manualmente para fechar um dos braços do labirinto, forçando o animal a entrar no outro braço (treino de alternância). No final de cada um dos braços havia uma plataforma fixada na parede do labirinto, onde o animal

poderia subir para fugir da água. A posição da plataforma foi alternada em cada um dos braços ao longo das tentativas (direito e esquerdo). O labirinto em T aquático foi colocado dentro de um tanque circular de 150 cm de diâmetro e 39cm de altura, preenchido com água e adicionado 2L de leite para tornar a água opaca, mantida a uma temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Esse tanque contendo o labirinto aquático estava localizado no centro de sala ampla, sobre um estrado de madeira 8cm acima do chão. Inicialmente, os animais foram habituados ao labirinto em T por três dias consecutivos. Os ratos foram colocados no labirinto e permitidos explorarem livremente até encontrarem uma das plataformas colocadas nos dois braços do labirinto em T. Ao encontrar uma delas permaneciam no local por um intervalo de 10 segundos e em seguida, após secagem, voltaram para suas gaiolas. Ao término da fase de habituação, os animais passaram por uma fase de treino de alternância forçada durante cinco dias consecutivos, os quais foram colocados na passagem principal e forçados a entrar em um dos braços para encontrar a plataforma, uma vez que o outro braço estava bloqueado. Nesta fase foram realizadas 10 tentativas diárias, sendo que em cinco tentativas o animal foi forçado a entrar no braço direito e cinco tentativas no braço esquerdo, com um intervalo de 10 segundos entre as tentativas de alternância forçada. No dia seguinte, ao final da fase de treino de alternância forçada, os animais iniciaram os testes de alternância tentativa-pariada. Cada par consiste de uma tentativa forçada, com os animais tendo acesso a um dos braços do labirinto, e tentativa de escolha, na qual os animais podiam escolher em qual braço deveriam entrar para encontrar a plataforma. A tentativa forçada e de escolha foram separadas por atrasos ou intervalos de retenção de 10 (grupo 1) e de 30 segundos (grupo 2). Durante a tentativa de escolha, somente o braço que estava bloqueado na tentativa forçada continha a plataforma e se o animal entrasse no braço onde a plataforma se encontrava anteriormente era considerado um erro de alternância. O

teste terminava somente quando o animal conseguisse atingir um critério de desempenho de 3 dias consecutivos com 80% ou mais de acertos<sup>25</sup>. Um intervalo de 25s separava cada par de tentativa (forçada/escolha). Cada bloco de tentativas consistia de 10 pares de tentativas, com igual número de entradas nos braços direito e esquerdo, e não mais do que duas entradas forçadas consecutivas em uma mesma direção (ex: D-D-E-D-E-D-E-E-D-E).

### **Análise estatística**

Com relação ao peso corporal dos animais, os dados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) de 2 fatores (dieta X dia), utilizando o teste de *Newman-Keuls* para medidas repetidas (fator dia). Os dados obtidos no experimento I foram analisados pela ANOVA de 3 fatores (dieta x fase x tentativa) com medidas repetidas no fator tentativas. Quando apropriado, utilizou-se o teste de *Newman-Keuls* de comparações múltiplas. No experimento II utilizou-se ANOVA de fatores (dieta x intervalo). Para o experimento III foi utilizado ANOVA de 2 fatores (dieta x intervalo). Consideram-se estatisticamente significativos os valores de  $p$  menores que 0,05.

## **RESULTADOS**

### **Peso Corporal**

Os ratos desnutridos pesaram significativamente menos que os ratos controle durante todo o período de exposição à dieta (lactação e pós-lactação até 49 dias). Aos 70 dias de idade (início dos testes) os animais controle pesaram em média  $449,02 \pm 6,47g$  (média  $\pm$  EPM) enquanto os desnutridos pesaram  $180,81 \pm 3,18$  (média  $\pm$  EPM), uma diferença estatisticamente significativa ( $t_{(140)} = 36,86$ ;  $p < 0,001$ ). Esta diferença de peso

parece persistir mesmo com um longo período de recuperação, como observado nos ratos utilizados no experimento I, que foram novamente pesados, antes da 2ª fase. A comparação dos pesos dos animais controle e desnutridos aos 70 dias (início da 1ª fase) e aos 250 dias (início da 2ª fase) mostrou que houve um efeito significativo do fator dieta [ $F(1,25) = 203,3; p < 0,001$ ], do fator dia [ $F(1,25) = 1152,07; p < 0,001$ ] e da interação dos fatores dieta x dia [ $F(1,25) = 18,11; p < 0,001$ ].

### **Experimento I - Memória Operacional no Labirinto Aquático de Morris**

Na análise das latências de fuga dos animais controle e desnutridos, durante as seis sessões de treino, foi observado um efeito significativo do fator dieta [ $F(1,25) = 7,38; p < 0,05$ ] e do fator tentativa [ $F(23,575) = 10,28; p < 0,001$ ], porém, não houve efeito significativo da interação dos fatores dieta x tentativa. As latências para ambos os grupos nutricionais foram diminuindo ao longo das tentativas, chegando à 24ª tentativa (dia 6) com uma redução de cerca de 80% para os controle e 50% para os desnutridos relativos à primeira tentativa da primeira sessão (Figura 1A).

A análise do tempo gasto em cada quadrante na *probe trial* mostrou um efeito significativo do fator quadrante [ $F(3,78) = 17,8; p < 0,001$ ] e na interação dos fatores dieta x quadrante [ $F(3,78) = 3,53; p < 0,05$ ]. Não houve efeito significativo do fator dieta. Esses resultados mostram que os ambos os grupos nutricionais lembraram onde a plataforma se localizava na última sessão do teste (quadrante 1) (Figura 1B).

Seis meses após o término da primeira fase do experimento, os animais passaram por uma fase de “re-teste” (fase 2) para se avaliar a retenção das informações em longo prazo. Os dados, comparando a fase 1 com a fase 2, apresentaram um efeito significativo do fator dieta [ $F(1,50) = 5,46; p < 0,05$ ], do fator fase [ $F(1,50) = 61,26; p < 0,001$ ], do fator

tentativa [ $F(23,1150) = 16,65$ ;  $p < 0,001$ ] e na interação dos fatores dieta x fase [ $F(1,50) = 4,86$ ;  $p < 0,05$ ]. Os resultados mostram que as latências de fuga para encontrar a plataforma em ambos os grupos nutricionais foram significativamente menores na fase 2, sugerindo que de alguma forma as informações adquiridas na fase 1 ficaram armazenadas e puderam ser evocadas novamente (Figura 2A). No entanto, a análise dos dados dentro da fase 2 não apresentou diferença significativa entre os animais desnutridos e controles. Nesta fase houve apenas efeito de tentativas [ $F(23, 575) = 7,09$ ;  $p < 0,001$ ].

A *probe trial* também foi realizada novamente nos mesmos procedimentos e os resultados apresentaram um efeito significativo no fator quadrante [ $F(3,141) = 32,78$ ;  $p < 0,001$ ] e na interação dos fatores dieta x fase x quadrante [ $F(3,141) = 2,72$ ;  $p < 0,001$ ]. Porém, não houve efeito significativo do fator dieta, do fator fase e das interações dieta x fase, dieta x quadrante e fase x quadrante. Na fase 2, os animais desnutridos também gastaram um tempo significativamente maior no quadrante 1 (Figura 2B). A análise da *probe trial* somente na fase 2 também não mostrou diferença significativa entre os animais controle e desnutridos, mas houve efeito significativo do fator quadrante [ $F(3,75) = 25,62$ ;  $p < 0,001$ ] e da interação dieta x quadrante [ $F(3,75) = 4,30$ ;  $p < 0,05$ ]. Este resultado é um bom indicativo de uma melhor aprendizagem dos animais desnutridos nesta fase, uma vez que eles mostram uma maior preferência pelo local onde a plataforma se localizava anteriormente

## **Experimento II - Memória de reconhecimento**

Os dados coletados neste segundo experimento para avaliação da memória de reconhecimento entre dois objetos, com 3 ou 24 horas de intervalo, mostraram efeito significativo do fator dieta [ $F(1,20) = 8,52$ ;  $p < 0,05$ ], porém, não houve efeito significativo

do fator intervalo e da interação dos fatores dieta x intervalo. Estes resultados mostram que os animais desnutridos apresentam menor reconhecimento independente do intervalo entre as tentativas de habituação e de reconhecimento (Figura 3).

### **Experimento III - Memória operacional no Labirinto em T Aquático**

Com relação ao experimento no labirinto em T aquático, foi analisado o número total de tentativas necessárias para que animais adquirissem um nível estável de desempenho (80% de acertos em 3 dias consecutivos), com 10 e 30 segundos de intervalo. Este número de tentativas foi calculado multiplicando o número de tentativas diárias (20) pelo número de dias gasto para atingirem o critério proposto. Os resultados mostram um efeito significativo somente no fator intervalo [ $F(1,43) = 53,03$ ;  $p < 0,001$ ]. Não houve diferença significativa do fator dieta e da interação dos fatores dieta x intervalo. Na figura 4 pode ser observado que no intervalo de 30s entre as tentativas forçada-escolha, os animais de ambos grupos nutricionais demoram mais para atingirem o critério proposto.

## **DISCUSSÃO**

Existem inúmeros relatos na literatura de que a desnutrição protéica ocorrendo em estágios iniciais da vida produz, além das alterações morfológicas e neuroquímicas no SNC<sup>3,5,6,7,8,9</sup>, uma redução marcante no peso corporal<sup>12,13</sup>. Os resultados encontrados no presente trabalho confirmam os resultados descritos na literatura, tendo em vista que tanto as ratas-mães quanto os filhotes que receberam dieta com deficiência de proteína pesaram menos durante o período de lactação. O procedimento de recuperação nutricional não se mostrou muito eficiente com relação ao peso corporal dos animais desnutridos, uma vez que o seu peso não se iguala ao peso dos animais controle, mesmo após seis meses de

recuperação, evidenciando os efeitos permanentes da desnutrição. Este baixo peso corporal pode ser resultante da adaptação do organismo às condições precárias impostas pela desnutrição. Segundo Morgane *et al.*<sup>7</sup>, a proteína não atravessa a placenta em quantidades significativas, mas é essencial para fornecer os aminoácidos para a mãe e para o feto sintetizarem proteínas. A omissão de um simples aminoácido (metionina, triptofano, lisina, etc) para o feto pode causar sérios prejuízos para o seu desenvolvimento cerebral.

Estudos realizados anteriormente sobre os efeitos da desnutrição na aprendizagem e memória, utilizando o labirinto aquático de Morris, mostram que animais desnutridos apresentam déficits no desempenho destas tarefas. Essa deficiência apresentada pelos desnutridos pode ser atribuída às alterações que a desnutrição produz na formação hipocampal, visto a sua importância nos processos de aprendizagem e memória.

Existem inúmeros trabalhos na literatura para avaliação dos comportamentos que indicam processos de aprendizagem e memória espacial em animais utilizando diferentes aparatos como labirinto radial<sup>10</sup>; labirinto em T – tarefa de alternância espacial<sup>25</sup>, o labirinto aquático de Morris<sup>11,12,13</sup>, como também o campo aberto<sup>25,26,27</sup>.

Fukuda *et al.*<sup>12</sup> utilizando procedimento semelhante de desnutrição protéica pós-natal (0 – 49 dias) e o labirinto aquático de Morris com pistas distais e proximais, mostraram que na versão “pista proximal“ a latência de fuga para encontrar a plataforma em ambos os grupos nutricionais não difere significativamente. No entanto, na versão “pista distal”, onde não são oferecidos sinais visuais, os animais desnutridos apresentaram um desempenho inferior comparado ao grupo controle, visto que apresentaram uma maior latência de fuga para encontrar a plataforma e uma maior distância percorrida.

Valadares & Almeida<sup>13</sup>, utilizando diferentes tipos de práticas de treino (1, 4, 8, 12 e 24 tentativas/dia) no labirinto aquático de Morris com pistas distais, observaram que a

desnutrição protéica prejudicou o desempenho dos animais, somente quando utilizadas práticas espaçadas (1 e 4 tentativas/dia). Nas práticas condensadas (8, 12 e 24 tentativas/dia) este prejuízo não foi observado.

Com relação à latência de fuga, os resultados obtidos mostraram que tanto os animais controle quanto os desnutridos aprenderam a tarefa de localizar a plataforma oculta nos diferentes quadrantes, porém, os animais desnutridos apresentaram uma maior latência comparado aos controle. Este resultado sugere que a desnutrição prejudicou a aprendizagem e memória operacional destes animais.

Na primeira tentativa de cada sessão, os animais gastaram uma maior latência de fuga, porém, esse tempo diminuía ao longo das tentativas. Isto sugere que os animais encontravam uma nova estratégia de navegação espacial para encontrar a plataforma que se encontrava em local diferente ao da sessão anterior. Esta rigidez comportamental é característica dos animais desnutridos, que após terem aprendido uma estratégia para solucionar um problema, persistem nela por um longo período de tempo, mesmo que sua resposta não seja mais efetiva<sup>29</sup>. No último dia de teste (6º dia) a latência de fuga dos animais para encontrar a plataforma chegou a diminuir cerca de 80% para os controle e de 50% para os desnutridos. Portanto, pode-se dizer que, embora os animais tenham aprendido a tarefa de encontrar a plataforma em diferentes locais, a desnutrição protéica pós-natal afetou o desempenho destes animais. Na realização da 2ª fase do experimento, foi observada uma diminuição significativa nas latências para ambos grupos nutricionais, sugerindo que de alguma forma estes animais armazenaram algumas das informações da tarefa espacial durante 6 meses. Não foi encontrada diferença no desempenho entre os animais que passaram por um período de desnutrição e recuperados e os animais controle na realização da tarefa nesta fase. Isto sugere que o procedimento de recuperação

nutricional durante os seis meses após a primeira fase foi eficiente em reverter algumas das alterações que a desnutrição protéica possa ter causado, principalmente na formação hipocampal. Estudos mostram que a recuperação nutricional é eficiente para reverter as alterações nas fibras colinérgicas hipocampais<sup>18</sup>, reorganização das fibras musgosas e restabelecimento da área ativa do botão sináptico<sup>19</sup>. Estudos comprovam que há uma correlação entre as projeções das fibras musgosas e das fibras colinérgicas hipocampais com o desempenho no labirinto aquático de Morris. Estas fibras são prejudicadas pela desnutrição protéica, mas são revertidas com o período de recuperação nutricional<sup>23</sup>.

Conforme já foi relatado em muitos trabalhos, as tarefas de aprendizagem e memória são mediadas pela formação hipocampal<sup>22,29</sup>. A desnutrição protéica parece produzir importantes alterações morfológicas e neuroquímicas no SNC<sup>3</sup>, sendo que a formação hipocampal é uma estrutura muito afetada pela desnutrição protéica pós-natal, tanto na morfologia como também na neuroquímica<sup>19,20</sup>, uma vez que o seu desenvolvimento continua neste período até por volta dos 35 dias de idade<sup>7</sup>. Estas alterações podem ajudar a interpretar as diferenças encontradas entre os animais desnutridos e controle nos diferentes procedimentos usados neste estudo.

Os resultados obtidos se assemelham aos de Rollof *et al.*<sup>22</sup>, que estudaram o desempenho de um modelo animal de doença de Alzheimer induzida em ratos no labirinto aquático de Morris, analisando a memória operacional e observaram déficits no desempenho destes animais. Esta doença produz degenerações em regiões cerebrais compostas por uma parte do lobo temporal medial, incluindo hipocampo e amígdala, estruturas que estão relacionadas com o processamento da aprendizagem e memória.

A *probe trial* (plataforma removida) mostrou que os animais controle e desnutridos, na fase 1, permaneceram preferencialmente no quadrante 1, onde a plataforma se localizava

na última sessão de treino. Na fase 2, esta preferência pelo quadrante 1 persistiu para ambos os grupos nutricionais, sugerindo que todos os animais aprenderam a localização da plataforma espacialmente. No entanto, nesta fase, os animais desnutridos apresentaram uma preferência ainda maior pelo quadrante 1 comparados aos controle, salientando uma melhor estratégia para encontrar a plataforma ou até mesmo por sua maior persistência numa mesma estratégia. A *probe trial* é um teste realizado para se determinar a precisão da aprendizagem espacial do animal, representada pelo tempo gasto no quadrante onde a plataforma se localizava, neste estudo, na última sessão de treino.

A desnutrição protéica precoce parece produzir importantes alterações morfológicas e neuroquímicas no SNC<sup>3</sup>, sendo a formação hipocampal uma estrutura muito afetada pela desnutrição pós-natal, tanto em sua morfologia como também em sua neuroquímica, uma vez que o seu desenvolvimento continua neste período até por volta dos 35 dias de idade<sup>7</sup>. Estas alterações podem ajudar a interpretar as diferenças encontradas entre os animais desnutridos e controle nos diferentes procedimentos usados neste estudo.

Com relação à memória de reconhecimento, os dados não mostraram diferenças entre os diferentes tipos de intervalos, ou seja, tanto com 3h quanto com 24h de intervalo entre as tentativas de habituação e de discriminação entre o objeto novo e o familiar, os desnutridos mostraram prejuízo no desempenho da memória de reconhecimento. Os animais desnutridos exploram menos o objeto novo, demonstrado através dos menores IRs desses grupos com relação ao grupo controle bem nutrido. Estes resultados sugerem que a desnutrição pode ter afetado a memória de reconhecimento destes animais devido às alterações produzidas no SNC. Esses dados são semelhantes aos obtidos por Dodart *et al.*<sup>25</sup>. Os autores avaliaram os efeitos de uma droga que atua no sistema de neurotransmissão colinérgico sobre a tarefa de reconhecimento de dois objetos no campo aberto, com

diferentes intervalos. Os resultados mostraram alterações significativas no desempenho dos animais tratados com a droga. Obinu *et al.*<sup>27</sup>, estudaram os efeitos de um agonista nicotínico na transmissão colinérgica e observaram que os animais experimentais exploraram mais o objeto novo. Estes dados confirmam a participação deste sistema no processamento da memória de reconhecimento.

Baseado nestes relatos se pode sugerir que as diferenças encontradas entre os animais desnutridos no período pós-natal e os controle são resultantes das alterações produzidas pela desnutrição protéica na formação hipocampal e nos sistemas de neurotransmissão colinérgico. Esta tarefa de reconhecimento de objeto parece ser um paradigma com grande utilidade nos estudos de memória de reconhecimento a curto-prazo, como também para estudar o fenômeno de habituação a ambientes novos<sup>25</sup>.

Com relação aos experimentos no labirinto em T aquático, os animais desnutridos e controle não apresentaram diferenças em seus desempenhos, isto é, esta tarefa de avaliação da memória operacional parece não ter sido afetada pela desnutrição protéica. No grupo submetido ao intervalo de 30s os animais apresentaram maior número de dias para atingirem o objetivo comparado ao grupo com 10s, porém, não houve diferença entre os grupos nutricionais.

Tarefa semelhante foi realizada por Stefani & Moghaddam<sup>23</sup> para avaliar os efeitos das alterações no córtex pré-frontal produzidas por drogas psicoestimulantes sobre a memória operacional em ratos. Os autores observaram uma alteração significativa no desempenho dos animais tratados com os psicoestimulantes, como resultado das modificações morfológicas e funcionais do córtex pré-frontal induzida por estas drogas. Estes resultados podem explicar, em parte, os obtidos no presente trabalho. A semelhança no desempenho dos animais controle e desnutridos nesta tarefa sugere que a desnutrição

protéica pós-natal talvez não tenha produzido alterações importantes no córtex pré-frontal, ou o período de recuperação tenha sido suficiente para reverter estas alterações, uma vez que, esta área parece estar envolvida nas tarefas de memória operacional. Alguns pesquisadores utilizaram técnicas de imagens eletrofisiológicas para identificar as áreas do cérebro envolvidas nas tarefas de memória operacional e encontraram ativações nos córtex pré-frontal, pré-motor, parietal e occipital durante estas tarefas<sup>30</sup>.

A divergência entre os resultados encontrados nas tarefas de memória operacional no labirinto aquático de Morris e no labirinto em T aquático talvez possa ser explicada pelo fato de que no experimento I, são utilizadas pistas distais para solucionar a tarefa espacial, enfatizando a função da formação hipocampal, cujas alterações em decorrência da desnutrição protéica são bem discutidas na literatura. Além das estruturas anteriormente mencionadas, existem relatos sobre a participação da formação hipocampal na tarefa realizada no labirinto em T aquático. No entanto, nesta tarefa os animais também fazem uso de estímulos proprioceptivos e de pistas proximais no próprio labirinto em T para a escolha do braço correto. Isto sugere que o modelo de desnutrição utilizado neste estudo talvez não tenha produzido alterações importantes nestes sistemas. Entretanto, seriam necessárias as realizações de medidas neuroquímicas e morfológicas nestes animais após os testes para avaliar os efeitos que a desnutrição produziu no SNC e, assim, fundamentar melhor as relações entre as estruturas e os dados comportamentais de aprendizagem e memória obtidos neste estudo.

## **CONCLUSÃO**

Com base nos objetivos propostos e nos resultados obtidos conclui-se que a desnutrição protéica pós-natal causou prejuízos na aprendizagem e memória operacional

dos animais quando testados na vida adulta no labirinto aquático de Morris. Este prejuízo persistiu por longos períodos de tempo. Porém, a memória operacional testada no labirinto em T aquático não foi alterada pela desnutrição, independente do intervalo utilizado.

A memória de reconhecimento também foi alterada pela desnutrição protéica pós-natal, independente do intervalo entre as tentativas, mostrando que os animais desnutridos reconhecem menos os objetos.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. Os autores agradecem Dalmo C. P. Nicola pela assistência técnica.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Truswell, AS. Protein versus energy in protein energy malnutrition. South African Med J 1981; 59: 753-756.
2. Morgane PJ, Austin –Lafrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J & GallerJR. Malnutrition and the developing central nervous system. In: Issacson RL, Jensen KF, editors. The vulnerable brain and environmental risks: malnutrition and hazard assessment, vol.1. New York: Plenum Press;1992, p. 3-44.
3. Galler JR, Shumsky JS & Morgane PJ. Malnutrition and brain development. In: Nutr Ped. 2. ed. New York: Plenum Press; 1995,cap.14, p.1-55.
4. Strupp BJ & Levitisky AD. Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. J Nutr 1995; 125:2221s-2232s.

5. Almeida SS, Tonkiss J & Galler JR. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 1996; 20: 389-402.
6. Morgane PJ *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17: 91-128.
7. Morgane PJ; Mokler DJ & Galler JR. Effects of protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26 (4): 471-83.
8. Lister JP *et al.* Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. *Hippocampus* 2005; 15: 393-403.
9. Bonatto F *et al.* Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res* 2005; 1042: 17-22.
10. Hall RD. Is Hippocampal function in the adult rat impaired by early protein or protein-calorie deficiencies? *Dev Psychobiol* 1983; 16(5): 395-411.
11. Cordoba NE, Arolfo MP, Brioni JD & Orsingher OA. Perinatal undernutrition impairs spatial learning in recovered adult rats. *Acta Physiol Pharmacol Ther latinoam* 1994; 44: 70-76.
12. Fukuda MTH, Françolin-Silva AL & Almeida, SS. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. *Behav Brain Res* 2002; 133: 271-277.
13. Valadares CT & Almeida SS. Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water maze. *Nutr Neurosci* 2005; 8(1): 39-47.

14. Tonkiss J *et al.* Chlordazepoxide-induced spatial learning deficits: dose-dependent differences following prenatal malnutrition. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 65: 105-116.
15. Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ & Morgane PJ. Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. *Brain Res* 1990; 515: 45-50.
16. O'Keefe JB & Nadel R. *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon, England: Oxford University Press; 1978. 570p.
17. Andrade JP, Castanheiras-Vale AJ, Paz-Dias PG, Madeira MD & Paula-Barbosa MM. The dendritic trees of the neurons from the hippocampal formation of adult protein-deprived rats. A quantitative Golgi study. *Exp Brain Res* 1996; 109: 419-433.
18. Andrade JP & Paula-Barbosa MM. Protein malnutrition alters the cholinergic and GABAergic system of the hippocampal formation of the adult rats: an immunocytochemical study. *Neurosc Lett* 1996; 211: 211-215.
19. Mcgaugh JL. Dissociating learning and performance: Drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Res Bull* 1989; 23:339-345.
20. Lamberty Y. & Gower AJ. Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a morris-type water maze. *Arch internat pharmacodyn therap* 1991; 309:5-19.
21. Olton DS & Papas BC. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 1978; 17(6): 669-682.
22. Roloff EVL, Platt B & Riedel G. No spatial working memory deficit in  $\beta$ -amyloid-exposed rats. A longitudinal study. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26: 955-970.

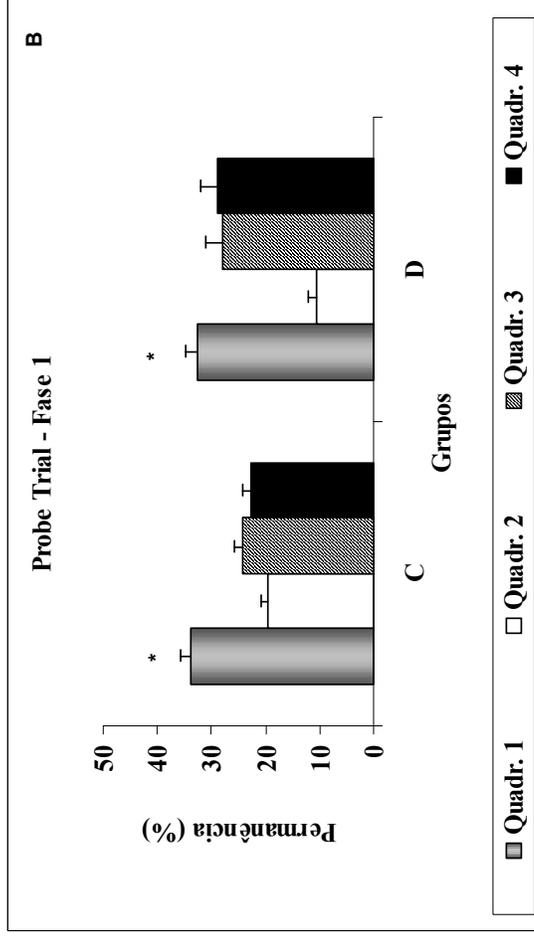
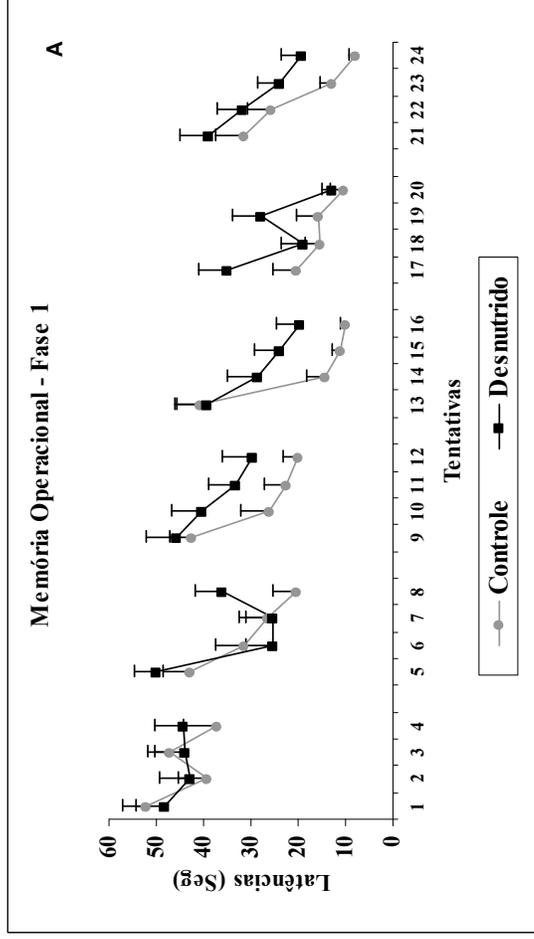
23. Lukoyanov NV & Andrade JP. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adults rats: relevance to morfological alterations in the hippocampal formation. *Behav Brain Res* 2000; 112: 85-97.
24. Stefani MR. & Moghaddam B. Effects of repeated treatment with amphetamine or phencyclidine on working memory in the rat. *Behav Brain Res* 2002; 134: 267-274.
25. Dodart JC, Mathis C & Ungerer A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *Neuroreport* 1997; 8: 1173-1178.
26. García-Moreno LM, Conejo NM, Capilla A, García-Sánchez O, Senderek K & Arias JL. Chronic ethanol intake and object recognition in young and adult rats. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26: 831-837.
27. Obinu MC, Reibaud M, Miquet JM, Pasquet M & Rooney T. Brain-selective stimulation of nicotinic receptors by TC-1734 enhances Ach transmission from frontoparietal cortex and memory in rodents. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26: 913-918.
28. Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 1981; 12: 239-260.
29. Tonkiss J & Galler JR. Prenatal protein malnutrition and working meory performance in adults rats. *Behav Brain Res* 1990; 40: 95-107.
30. Rooy CV, Stough C, Pipingas A, Hocking C & Silberstein RB. Spatial working memory and intelligence biological correlates. *Intelligence* 2001; 29: 275-292.

**Figura 1** - Latência de fuga (Média  $\pm$  EPM) dos animais controle (n = 14) e desnutridos (n = 13) durante as 24 tentativas (1A - 70 dias de idade) e porcentagem de tempo despendida pelos animais nos quatro quadrantes do labirinto aquático de Morris durante a *probe trial* (1B), na fase 1. \* p < 0,05 comparado aos outros quadrantes.

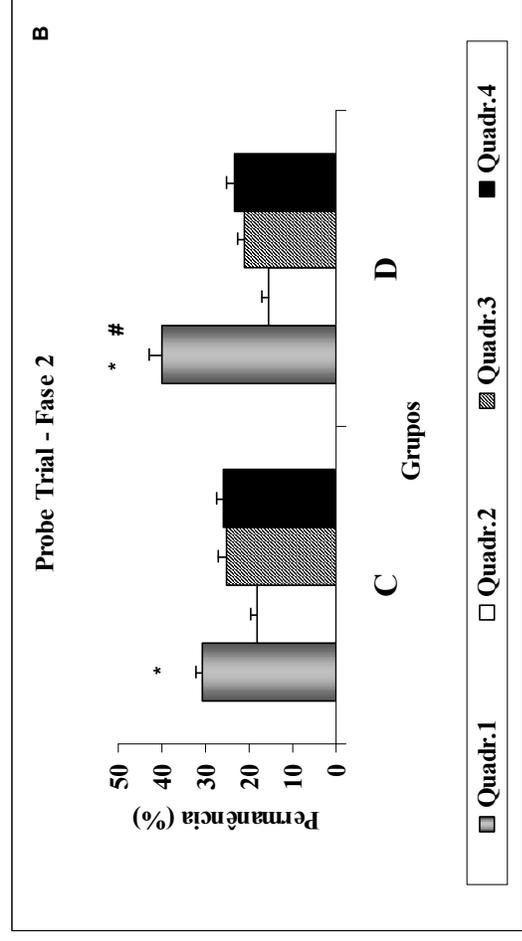
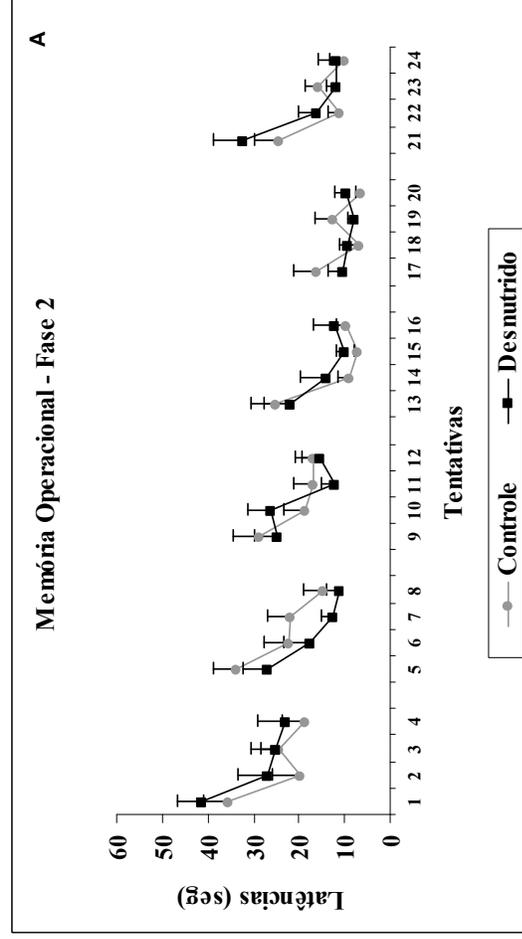
**Figura 2** - Latência de fuga (Média  $\pm$  EPM) dos animais controle (n = 14) e desnutridos (n = 13) durante as 24 tentativas (2A - 250 dias de idade) e porcentagem de tempo despendida pelos animais nos quatro quadrantes do labirinto aquático de Morris durante a *probe trial* (2B), na fase 2. \* p < 0,05 comparado aos outros quadrantes.

**Figura 3** - Índice de reconhecimento (Media  $\pm$  EPM) dos animais do grupo controle (n = 12/11) e desnutrido (n = 12/11) submetidos aos intervalos inter-tentativas de 3 horas e de 24 horas. \* p<0,05 comparado ao grupo controle.

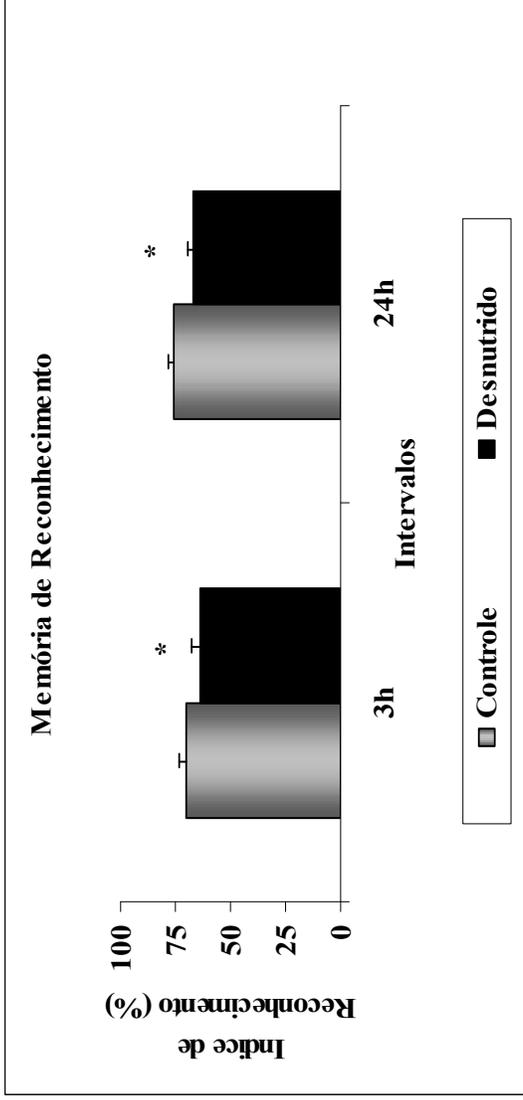
**Figura 4** - Número de tentativas (Media  $\pm$  EPM) necessárias para os animais controle (n = 12/11) e desnutridos (n = 12/10) para atingirem um nível estável de desempenho (80% de acertos em 3 dias) para a memória operacional no Labirinto em T aquático, com intervalos de 10 e 30s entre as tentativas forçada-escolha. \* p<0,05 comparado ao grupo submetido ao intervalo de 10s.



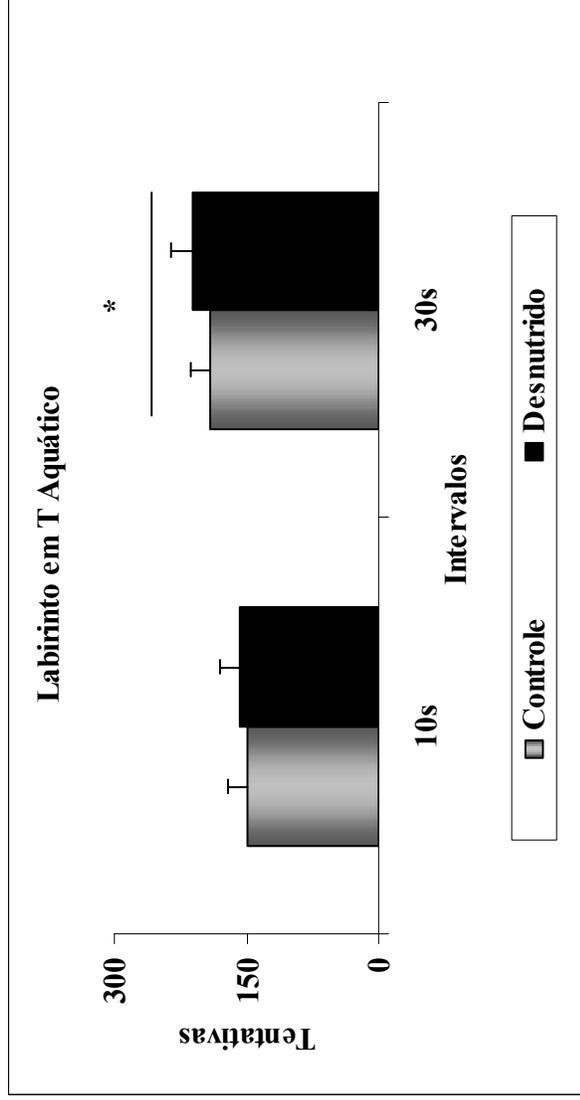
**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)