

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 do estresse agudo associado à desnutrição protéica precoce na
aprendizagem e memória de ratos submetidos ao labirinto aquático de Morris**

Lucas Duarte Manhas Ferreira do Vales

Ribeirão Preto - SP
2008

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 do estresse agudo associado à desnutrição protéica precoce na
aprendizagem e memória de ratos submetidos ao labirinto aquático de Morris**

Lucas Duarte Manhas Ferreira do Vales

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP,
para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
Psicobiologia.

Ribeirão Preto - SP
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Vales, Lucas D. M. F.

Efeitos do estresse agudo associado à desnutrição protéica precoce na aprendizagem e memória de ratos submetidos ao labirinto aquático de Morris. Ribeirão Preto, 2008.

70 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Almeida, Sebastião de Sousa.

1. Desnutrição protéica. 2. Estresse agudo. 3. Aprendizagem. 4. Memória espacial.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Duarte Manhas Ferreira do Vales

“Efeitos do estresse agudo associado à desnutrição protéica precoce na aprendizagem e memória de ratos submetidos ao labirinto aquático de Morris”

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Psicobiologia.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

RESUMO

VALES, L. D. M. F. Efeitos do estresse agudo associado à desnutrição protéica precoce na aprendizagem e memória de ratos submetidos ao labirinto aquático de Morris. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O objetivo do estudo foi investigar os efeitos do estresse agudo, associado à desnutrição protéica precoce, sobre os processos de aprendizagem e memória espacial de ratos no labirinto aquático de Morris (*Morris Water Maze* – MWM). Foram testados 102 ratos Wistar machos, divididos em 8 grupos (4 grupos no Experimento I e 4 grupos no Experimento II), de acordo com a condição nutricional nas fases de lactação e pós-lactação (controles, com dieta de 16% de proteína, ou desnutridos, com dieta de 6% de proteína), a exposição ao estresse (estressados ou não stressados) e o momento em que foi imposto o estresse (antes ou depois das sessões experimentais). Utilizou-se imobilização (período de 2h) como procedimento de estresse agudo. Foram realizadas duas sessões compostas de 12 tentativas cada, durante dois dias consecutivos, no MWM. Após a última tentativa do segundo dia de testes, a plataforma foi removida e foi imposto um período de 60s de livre natação (*probe trial* – 25ª tentativa). Foi registrado o tempo despendido e analisado o percentual de permanência em cada quadrante. A *probe trial* permite analisar a precisão com que o animal busca a plataforma e, conseqüentemente, a efetivação do aprendizado da tarefa. Decorridos 28 dias, os ratos foram submetidos a uma única tentativa (re-teste), com a finalidade de avaliar a consolidação da memória sobre o aprendizado adquirido. Os dados de peso corporal foram submetidos a uma ANOVA de dois fatores (dieta x dia) com repetição no fator dia. Os dados comportamentais foram submetidos a uma ANOVA de três fatores (dieta x estresse x tentativa) com repetição no fator tentativa; posteriormente, utilizou-se ANOVA de dois fatores (dieta x tentativa) com repetição do fator tentativa, entre grupos nutricionais distintos e ANOVA de dois fatores (estresse x tentativa) com repetição do fator tentativa, entre ratos stressados e não stressados do mesmo grupo nutricional. Quando apropriado, foi utilizado o teste *post hoc* de *Newman-Keuls* ($p < 0,05$). A desnutrição prejudicou o desempenho dos animais nesse modelo, além de ter provocado um déficit significativo de crescimento, quando comparados aos animais controles. No primeiro experimento, o estresse afetou apenas o desempenho dos animais desnutridos. Os animais do grupo desnutrido diminuíram significativamente as latências sob efeito do estresse. No segundo experimento, o estresse não produziu alterações no desempenho de ambos os grupos. Na *probe trial*, todos os grupos demonstraram prevalência de tempo no quadrante alvo, demonstrando que houve aprendizagem espacial em todas as condições de dieta e estresse. Os animais desnutridos apresentaram latências significativamente maiores na tentativa de re-teste nos dois experimentos, indicando prejuízos na recuperação das informações anteriormente processadas.

Palavras-chave: Desnutrição protéica, estresse agudo, aprendizagem, memória espacial.

ABSTRACT

VALES, L. D. M. F. Effects of acute stress associated to early protein malnutrition on learning and memory of rats submitted to the Morris water maze. Master Thesis – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The purpose of the present study was to investigate the acute stress associated to early protein malnutrition on learning and memory of rats submitted to the Morris water maze. One hundred and two Wistar male rats were divided in 8 groups (4 in Experiment I and 4 in Experiment II), according to the nutritional condition during the lactation and post-lactation phases (control -16% of protein or malnourished animals - 6% of protein), exposition to the stress (stressed or not stressed) and the moment of the stress exposure (before or after the experimental sessions). The procedure of the stress was immobilization for 2 hours. Two sessions of 12 trials each were accomplished for two consecutive days. After the last learning trial (trial 24) the platform was removed and it was imposed a period of 60 seconds of free swimming (*probe trial* – trial 25). The percentage of time spent on each quadrant was registered. The probe trial is an index of the spatial learning accuracy. After 28 days the rats were submitted to a single trial (retest) in order to evaluate memory consolidation. Body weight data was submitted to a two way ANOVA (diet x day) with repeated measure on day. The behavior data were submitted to a three way ANOVA (diet x stress x trial) with repeated measure on trial, followed by a two way ANOVA (diet x trial) with repeated measure on trial and a two way ANOVA (stress x trial) with repeated measure on trial. The *post hoc* test of *Newman-Keuls* ($p < 0.05$) was used when appropriated. The results showed that malnutrition impaired both body development and spatial learning and memory. In the first experiment only the malnourished group was affected by the stress procedure, with a significant decrease on latency after stress. No effects of stress were observed in the second experiment. Time spent on the probe trial was similar in all experimental conditions, indicating learning accuracy. The malnourished animals showed higher latencies on the retest phase of both experiments, evidencing deficits in retrieve early processed information.

Key-words: Protein malnutrition, acute stress, learning, spatial memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Perda de peso corporal das ratas-mães dos dois grupos nutricionais, durante o período de lactação	32
Figura 2.	Peso das ninhadas do grupo controle (C) e do grupo desnutrido (D), durante o período de lactação	33
Figura 3.	Peso dos filhotes durante o período de pós-lactação	34
Figura 4.	Latência de fuga dos animais dos 4 grupos experimentais, C, CE, D, DE, do Experimento I, nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris	35
Figura 5.	Latência de fuga dos animais dos grupos D e DE do Experimento I, nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris ..	36
Figura 6.	Latência de fuga dos animais dos grupos C e CE do Experimento I, nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris	37
Figura 7.	Latência de fuga dos animais dos grupos C e D do Experimento I, nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris	38
Figura 8.	Latência de fuga dos animais dos grupos CE e DE do Experimento I, nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris ..	39
Figura 9.	Tempo de permanência dos animais dos 4 grupos experimentais do Experimento I em cada um dos 4 quadrantes imaginários do labirinto aquático de Morris, na <i>probe trial</i>	40
Figura 10.	Latência de fuga dos animais dos 4 grupos experimentais do Experimento I, na última tentativa da primeira etapa de testes e após 28 dias (tentativa de reteste), no labirinto aquático de Morris	41
Figura 11.	Latência de fuga dos animais dos 4 grupos experimentais, C, CE, D, DE, do Experimento II, nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris	42
Figura 12.	Latência de fuga dos animais dos grupos D e DE do Experimento II, nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris ..	43
Figura 13.	Latência de fuga dos animais dos grupos C e CE do Experimento II, nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris ..	44
Figura 14.	Latência de fuga dos animais dos grupos C e D do Experimento II, nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris	45
Figura 15.	Latência de fuga dos animais dos grupos CE e DE do Experimento II, nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris ..	46
Figura 16.	Tempo de permanência dos animais dos 4 grupos experimentais do Experimento II em cada um dos 4 quadrantes imaginários do labirinto aquático de Morris, na <i>probe trial</i>	47
Figura 17.	Latência de fuga dos animais dos 4 grupos experimentais do Experimento II, na última tentativa da primeira etapa de testes e após 28 dias (tentativa de reteste), no labirinto aquático de Morris	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Alimentação referente a cada período de vida dos animais	25
Tabela 2.	Composição das dietas controle (16% de proteína) e experimental (6% de proteína)	26
Tabela 3.	Grupos de animais do Experimento I	27
Tabela 4.	Grupos de animais do Experimento II	27

SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1 Desnutrição: efeitos sobre o desenvolvimento	08
1.2 Labirinto Aquático de Morris	13
1.3 Estresse: alterações metabólicas e comportamentais	15
2. Objetivos	23
3. Material e Método	
3.1 Sujeitos	24
3.2 Composição das ninhadas	24
3.3 Alojamento e Manutenção dos Animais	24
3.4 Grupos de animais	26
3.5 Equipamento de teste	27
3.6 Procedimento de imobilização	28
3.7 Experimento I	29
3.8 Experimento II	31
3.9 Análise dos dados	31
4. Resultados	
4.1 Peso corporal	32
4.2 Experimento I	35
4.3 Experimento II	42
5. Discussão	
5.1 Tratamento Nutricional	49
5.2 Efeitos da interação entre estresse agudo e desnutrição	53
6. Conclusões	59
Referências	60

1. Introdução

1.1 Desnutrição: efeitos sobre o desenvolvimento

A desnutrição é um grave problema de saúde pública que afeta grande parcela da população mundial (WHO – *World Health Organization*, 2008). Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008) mostram que 54% das 10.8 milhões de mortes por ano de crianças com menos de cinco anos de idade estão relacionadas, direta ou indiretamente, à desnutrição. Em todo o mundo, existe cerca de 170 milhões de crianças subnutridas e com baixo peso corporal e 3 milhões dessas crianças morrem todo ano como consequência direta de estarem abaixo do peso (WHO, 2008).

A desnutrição crônica atinge aproximadamente 792 milhões de pessoas em todo o mundo e em suas formas graves torna-se mais nociva que diversas outras enfermidades (WHO, 2008).

Em países em desenvolvimento, a desnutrição atinge 20% da população e representa um problema bastante preocupante por estar relacionada a diversos fatores como pobreza, ineficiência ou ausência de serviços de saúde, saneamento básico, segurança, entre outros, geralmente interdependentes e capazes de agravar seus sintomas, aumentar o risco de doenças crônicas e reduzir drasticamente a qualidade e a expectativa de vida (WHO, 2000).

Mesmo em países ricos e desenvolvidos, como os Estados Unidos da América, os índices de segurança alimentar apresentam resultados preocupantes. Em 2004, a estimativa era de 11.9% de domicílios estadunidenses (aproximadamente 38 milhões de pessoas) em situação de *insegurança alimentar* (IA), que significa limitação de acesso quantitativo aos alimentos, em situação ou não de fome e miséria (NORD et al., 2005). Institutos de pesquisa como o USDA (United States Department of Agriculture) e o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) utilizam o índice de IA como uma medida de avaliação de risco quanto ao acesso da população a alimentos, situação de fome e desnutrição. De acordo com estes

institutos de pesquisa, o índice de insegurança alimentar é um fator determinante da condição de desnutrição.

No Brasil, segundo dados do IBGE, em estudo apresentado em 2004 sobre segurança alimentar, através de pesquisa nacional por amostra de domicílios (PNAD), foi estimado que 34,8% de domicílios (aproximadamente 72 milhões de pessoas) viviam em situação de IA, sendo 6,5% desses domicílios (cerca de 14 milhões de pessoas) em situação de IA grave, ou seja, restrição alimentar e experiência de fome (FERREIRA, 2004).

A função nutricional tem implicação direta sobre os processos de formação, desenvolvimento, organização funcional, maturação bioquímica e morfológica do organismo, sobretudo durante os estágios iniciais de desenvolvimento (GALLER et al., 1995; MORGANE et al., 1993; MORGANE et al., 2002). Portanto, quando se estuda os efeitos deletérios da desnutrição sobre o organismo é fundamental considerar o tipo de desnutrição (protéica, protéico-calórica, de vitaminas ou outros nutrientes), sua intensidade, duração e período da vida em que ocorre, bem como sua incidência concomitante a outros fatores, como aqueles relacionados a características do ambiente que também seriam capazes de influenciar o desenvolvimento físico e cognitivo.

Estudos sobre desnutrição infantil afirmam que é necessário analisar a desnutrição como um problema que, acompanhado de outros fatores agravantes (problemas econômicos, habitação, segurança, educação, saúde) constituem um quadro bastante complexo, dada a dificuldade de estabelecer limites nítidos quanto à importância de cada um desses fatores como agentes causais em relação a qualquer efeito que se pretenda estudar (ARRUDA I., ARRUDA B., 1994; BARROS, 1993; CARVALHAES, BENÍCIO, 2002; ELIZABETH, SATHY, 1997; FALBO, ALVES, 2002; MOYSÉS, LIMA, 1982).

Acredita-se que, desde que se forneçam condições adequadas, é possível minimizar os efeitos decorrentes da desnutrição. Um dado que corrobora essa idéia é o resultado de estudos

sobre desnutrição secundária no início da vida (provocada não por carência alimentar, mas por alguma dificuldade no aproveitamento dos alimentos em consequência de alguma doença crônica) que, quando desvinculada de um contexto de privação global, ou seja, de outros fatores que possam agravá-la ou perpetuar a condição em que ocorre, parece comprometer menos o desenvolvimento cognitivo (CARVALHAES, BENÍCIO, 2002).

Diversos estudos têm demonstrado que distúrbios relacionados à função nutricional e, mais especificamente, à desnutrição são capazes de predispor o organismo a uma diminuição da imunidade, aumento da susceptibilidade a doenças e infecções, alterações comportamentais e problemas de aprendizagem, tanto em humanos quanto em animais (ARRUDA I., ARRUDA B., 1994; BEDI, 1991; CABALLERO, 2002; FALBO, ALVES, 2002; FUKUDA et al., 2002; FUKUDA et al., 2007; GALLER et al., 1995; GEORGIEFF, 2007; MORGANE et al., 2002; PAWELLEK et al., 2008; TONKISS et al., 1994; VICTORA et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2001).

A desnutrição protéica e protéico-calórica, quando ocorre durante o período pré-natal e nos primeiros anos de vida, pode produzir várias alterações neuroquímicas, neurofisiológicas e funcionais no sistema nervoso central (SNC) (ALMEIDA et al., 1996), e comprometimentos físicos, observados principalmente pelo retardo do crescimento (CAMBRAIA et al., 1997; MASSARO et al., 1974; PASSOS et al., 2000). Além destas alterações, estudos conduzidos em animais destacam também atraso no desenvolvimento cognitivo, como déficits de aprendizagem e de memória, e mudanças de alguns padrões comportamentais, tais como interação mãe-filhote, comportamentos sociais, maior impulsividade em testes de ansiedade, resistência na supressão de alguns padrões de respostas, como pressionar uma barra (ALMEIDA et al., 1991; ALMEIDA, DE-OLIVEIRA, 1994; ALMEIDA, DE ARAÚJO, 2001; DATTA, 2000; DURÁN et al., 2006; GALLER et al., 1995; DA SILVA HERNANDES et al., 2005; LUKOYANOV, ANDRADE, 2000; MORGANE et al., 1993;

MORGANE et al., 2002; RIUL et al, 1999; SMART, PREECE, 1973; TONKISS et al., 1991; TONKISS et al., 1994; WOLF et al., 1986).

A desnutrição produz, em médio e longo prazo, alterações em todo o metabolismo (MORGANE et al. 1993; MORGANE et al. 2002). O organismo tenta de diversas maneiras compensar as repercussões da carência alimentar, retardando o agravamento de seus sinais como, por exemplo, maior susceptibilidade a infecções, alterações em pele e pêlos, e déficits de memória. Um dos mecanismos que o organismo utiliza para minimizar os efeitos da desnutrição é a economia de energia, em função de uma menor oferta quantitativa ou qualitativa de nutrientes. Este mecanismo pode resultar em uma desaceleração do crescimento e do desenvolvimento físico e cognitivo (ALMEIDA et al., 1996; CAMBRAIA et al., 1997; DA SILVA HERNANDES et al., 2005; MORGANE et al., 1993; PASSOS et al., 2000), podendo levar à morte de acordo com a gravidade da desnutrição e conseqüente intensidade dos sintomas.

Em modelos de experimentação animal, torna-se possível controlar algumas variáveis que, no homem, são de difícil identificação e controle, porque envolvem fatores relacionados à estimulação ambiental, questões sociais, nível econômico, cultural, entre outros que, de maneira complexa, influenciam-se mutuamente.

A utilização de modelos animais não constitui um paradigma simples. A desnutrição protéica ou protéico-calórica introduzida no período de lactação interfere na interação mãe-filhote e produz alterações no comportamento materno relativo aos cuidados com a prole (RIUL et al., 1999; SMART, PREECE, 1973). Ao mesmo tempo, a redução na quantidade de proteínas ingerida pela rata-mãe pode afetar a qualidade e reduzir a quantidade de leite produzido, causando uma diminuição dos aminoácidos necessários ao crescimento e desenvolvimento dos filhotes (CAMBRAIA et al., 1997; CRNIC, CHASE, 1978; DA SILVA HERNANDES et al., 2005; PASSOS et al., 2000; PINE et al., 1994).

É importante destacar que existe uma analogia entre os sistemas neurais de humanos e ratos (IZQUIERDO, 2002). Por esse motivo, as alterações provocadas pela desnutrição protéica precoce sobre o crescimento e desenvolvimento do SNC são parecidas em ambos. Alguns exemplos dessas alterações são: menor tamanho cerebral, menor número de células, alterações na ramificação dendrítica e na camada de mielina dos neurônios e alterações na atividade de vários sistemas enzimáticos (MORGANE et al., 1993; MORGANE et al., 2002).

Dentre as regiões do SNC prejudicadas pela desnutrição precoce, uma estrutura do encéfalo particularmente afetada é a formação hipocampal. Comumente, alterações no funcionamento dessa estrutura, como déficits no contato sináptico e em seus sistemas de neurotransmissores que constituem as bases neuroquímicas dos processos de memória, estão associadas a déficits de aprendizagem e memória espacial (BEDI, 1991; CINTRA, et al., 1990; FUKUDA et al., 2002; FUKUDA et al., 2007; LUKOYANOV, ANDRADE, 2000; MORGANE et al., 1993; MORGANE et al., 2002). Estudos que avaliam os efeitos da desnutrição protéica sobre aprendizagem, memória e comportamento atribuem maior importância às alterações produzidas nessa estrutura. A neurogênese dessa estrutura tem seu desenvolvimento no período pré-natal, estendendo-se ao período pós-natal, tanto em ratos como em humanos, com um de seus picos de crescimento e desenvolvimento durante este período (MORGANE et al., 2002). Deste modo, a desnutrição protéica e protéico-calórica imposta durante essa fase de desenvolvimento (período pré-natal e infância) pode comprometer a formação dessa estrutura prejudicando o processamento de informações espaciais e produzindo déficits de memória e de aprendizagem.

De acordo com a teoria de *Mapa Cognitivo* proposta por O'Keefe e Nadel em 1978, o hipocampo constitui-se em uma estrutura do SNC envolvida nos processos de aprendizagem e memória espacial. Segundo estes autores, o organismo seria capaz de estabelecer relações entre as pistas ou estímulos associados a um determinado contexto espacial e suas posições

relativas, construindo representações espaciais do ambiente (mapas cognitivos), a partir do processamento de informação espacial pelo hipocampo. Deste modo, a partir da exploração do ambiente, manipulação de objetos (estímulos) e reconhecimento de pistas em um contexto espacial específico, o animal processa as informações necessárias para a representação do ambiente em mapas cognitivos.

O processamento e o armazenamento de informações (funções da memória) são fundamentais para que ocorra a aprendizagem. Informações armazenadas passam por processos de contínua categorização e re-categorização, até o momento em que possam ser recuperadas e reutilizadas. Este mecanismo é essencial para a sobrevivência do animal em diversas condições ambientais (IZQUIERDO, 2002).

A maior parte dos conceitos sobre aprendizagem e memória surgiu em modelos de experimentação animal em labirintos (OLTON, 1979). Diferentes modelos têm sido utilizados no estudo da aprendizagem e memória espacial em animais desnutridos, tais como o labirinto radial (JORDAN et al., 1981; HALL, 1983), o labirinto em T – tarefa de discriminação (TONKISS, GALLER, 1990; JAISWAL et al., 1999), alternância espacial (WOLF et al., 1986; CASTRO et al., 1989) e o labirinto aquático de Morris (CAMPBELL, BEDI, 1989; TONKISS et al., 1994; LUKOYANOV, ANDRADE, 2000; FUKUDA et al., 2002; FUKUDA et al., 2007). Dentre os modelos citados, o labirinto aquático de Morris (*Morris Water Maze – MWM*) tem sido o mais utilizado (D’HOOGHE, DE DEYN, 2001).

1.2 Labirinto Aquático de Morris

O modelo descrito por Morris em 1981 consiste em um tanque circular, preenchido com água (tornada opaca pela adição de leite), e uma pequena plataforma de fuga. Morris desenvolveu este modelo para investigar orientação e memória espacial em ratos. O MWM pode ser utilizado para o estudo de duas tarefas distintas de navegação espacial. Na versão

classificada como pista proximal, a plataforma permanece visível (alguns centímetros acima do nível da água) e o animal pode nadar em direção a ela sem a necessidade de que existam outras pistas ou estímulos no ambiente que facilitem sua navegação em direção à plataforma. Nesta versão proximal, o animal pode utilizar-se do sistema de táxon (estratégias de guiamento e orientação através de rotações corpóreas egocêntricas em resposta a uma pista ou informação espacial). Em uma outra versão, classificada como pista distal, a plataforma é fixada em local pré-estabelecido, submersa 1 cm abaixo do nível da água e, em áreas externas ao labirinto são oferecidas pistas visuais, tais como figuras nas paredes, porta e janelas. Nesta versão não existem pistas locais que indicam a posição da plataforma e o animal deve nadar para um local específico, baseando-se apenas nas pistas/informações externas ao aparelho, utilizando-se de um sistema de mapeamento espacial (formação de mapas cognitivos). Para escapar da água, o animal precisa localizar uma plataforma que não é possível ver, ouvir ou cheirar. O comportamento de fuga de um estímulo aversivo, neste caso a água, é natural em ratos (D'HOOGE, DE DEYN, 2001).

No modelo do MWM, alguns parâmetros de registro são utilizados para a análise do desempenho dos animais. O principal sistema de registros é a *latência*, ou seja, o tempo gasto pelo animal para completar a tarefa. Além desse, há outros parâmetros de registro utilizados, tais como: o *comprimento do traçado* – caminho percorrido pelo animal para chegar à plataforma; a *velocidade de deslocamento* – medida direta da motivação dos animais na tarefa; o *ângulo inicial de divergência* em relação à plataforma – indica a precisão no deslocamento inicial; a *probe trial* – tentativa sem a plataforma, para análise da precisão de navegação do animal em busca da plataforma – registro do tempo total gasto em cada um dos quadrantes imaginários, análise do percentual de tempo despendido no quadrante alvo (posição anterior da plataforma) e frequência com que os animais cruzam o centro do quadrante alvo (SANTOS, 1999).

A conservação das informações espaciais, adquiridas durante o procedimento de teste, pode ser estudada durante períodos de tempo distintos e ao longo de toda a vida do animal. Dessa maneira, pode-se investigar a possível perda de informações, associada ao envelhecimento, assim como o envolvimento de regiões críticas com os processos de manutenção, arquivamento e evocação de memórias de longa duração (SANTOS, 1999).

O MWM representa uma ferramenta apropriada no estudo da memória espacial operacional e referencial e, conseqüentemente, no estudo e observação de comportamentos intrínsecos ao processo de aprendizagem espacial.

A preferência por esse modelo para o estudo envolvendo animais desnutridos é justificada pela vantagem de não ser necessário a utilização de qualquer tipo de recompensa alimentar. Esse tipo de recompensa, além de servir como pista visual e/ou olfativa, poderia motivar mais intensamente o comportamento de animais desnutridos (BEDI, 1992).

1.3 Estresse: alterações metabólicas e comportamentais

Tendo em vista os efeitos da desnutrição sobre o desenvolvimento físico e sobre a formação hipocampal, pode-se aventar uma conexão importante entre a desnutrição e as alterações produzidas pelo estresse no funcionamento do SNC, principalmente sobre os processos de aprendizagem e memória.

O termo estresse foi originalmente utilizado na física para descrever o processo pelo qual uma força exerce tensão física sobre uma estrutura qualquer, colocando em risco sua estabilidade. Introduzido nas ciências biológicas, pelo fisiologista canadense Hans Selye, em 1936, o estresse foi descrito como uma resposta geral do organismo a uma ameaça real ou potencial à homeostase (JEANSOK, DIAMOND, 2002; JOCA et al., 2003). Na atualidade, além dos estressores físicos descritos inicialmente, fatores psicológicos e sociais, também são

aceitos e utilizados como agentes estressores, na indução de alterações comportamentais e fisiológicas.

Em sociedades muito populosas e com maior expectativa de vida, o estresse tem se tornado um problema de saúde pública e fatores ambientais que o predispõem têm sido estudados como capazes de promover uma série de problemas psicológicos, tais como, dificuldades de concentração, irritação excessiva, dificuldades em tomar decisões e desordens do sono (WHO, 2005). Quando muito intenso ou prolongado, o estresse pode predispor a transtornos depressivos e desencadear ou exacerbar desordens psiquiátricas, tais como esquizofrenia e algumas síndromes relacionadas à ansiedade de estresse pós-traumático. O estresse também está associado a um aumento no consumo de drogas (álcool, tabaco e outras drogas de abuso), comportamentos violentos, dependência de tecnologias modernas (que podem resultar em modificações no estilo de vida como, por exemplo, sedentarismo) e mudanças nos hábitos alimentares (WHO, 2008).

As respostas do organismo a situações de estresse são moduladas por alterações neuroquímicas, fisiológicas e comportamentais, e envolvem mecanismos adaptativos que permitem que o organismo reaja de maneira eficaz a ameaças reais ou potenciais à sobrevivência (JEANSOK, DIAMOND, 2002; MCEWEN, SAPOLSKY, 1995; MCEWEN, 2000). Estes mecanismos adaptativos são substancialmente alterados frente a situações de estresse incontrolável e/ou duradouro e, nessas condições, o estresse pode produzir efeitos deletérios sobre diversos aspectos da cognição (MCEWEN, 2000). Alguns desses efeitos são atribuídos a mudanças reversíveis na morfologia de neurônios hipocampais ou perda neuronal permanente e estão relacionados a déficits de atenção e prejuízos significativos de memória (JEANSOK, DIAMOND, 2002; JOCA et al., 2003; MARGIS et al., 2003; MCEWEN, SAPOLSKY, 1995; MCEWEN, 2000; QUEVEDO et al., 2003).

Todavia, algumas evidências indicam que memórias relacionadas a eventos emocionais intensos como, por exemplo, experiências traumáticas, sejam formadas e consolidadas de maneira mais efetiva de acordo com a proporção de sua importância para a sobrevivência e sua evocação seria facilitada em situações semelhantes, como em estados de alerta, ansiedade ou estresse (JEANSOK, DIAMOND, 2002; JOCA et al., 2003; MARGIS et al., 2003; MCEWEN, 2000; QUEVEDO et al., 2003).

Embora apresentem um caráter de preservação da espécie, as respostas adaptativas ao estresse podem resultar também em sintomas associados de hipervigilância: ansiedade, disforia, resposta de sobressalto exacerbada, labilidade afetiva e hiperreatividade do sistema nervoso autônomo (MCEWEN, 2000; PATIN et al., 2005; QUEVEDO et al., 2003).

Muitos estudos farmacológicos, morfológicos, moleculares e eletrofisiológicos, têm encontrado evidências de que a formação hipocampal é uma estrutura envolvida tanto nos processos de aprendizagem e memória quanto na regulação neuroendócrina dos hormônios do estresse e, por conseguinte, nas alterações comportamentais causadas pela exposição a situações de estresse (JEANSOK, DIAMOND, 2002; JOCA et al., 2003; MARGIS et al., 2003; MCEWEN, SAPOLSKY, 1995; MCEWEN, 2000; QUEVEDO et al., 2003).

A memória não é um processo cognitivo passivo. Variáveis como o contexto em que as informações são processadas, experiência prévia, ou mesmo o estado glicêmico do organismo, modulam os tipos de informações que serão armazenadas e determinam a precisão com que ocorrerá a retenção e consolidação das mesmas (MCEWEN, SAPOLSKY, 1995). Um importante filtro desse processo é o estado emocional. A resposta orgânica a situações de estresse é determinada pela maneira com que o indivíduo percebe e reage aos estímulos do ambiente (JEANSOK, DIAMOND, 2002).

O hipocampo participa no processo de regulação da resposta ao estresse por *feedback* negativo, mediado por glicocorticóides, que inibe o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA)

(MCEWEN, SAPOLSKY, 1995; MCEWEN, 2000). O hipocampo possui dois tipos de receptores corticosteróides em abundância: tipo I, receptores mineralocorticóides, e tipo II, receptores glicocorticóides. Os hormônios esteróides que agem sobre esses receptores modulam de maneira bifásica a capacidade de armazenamento e recuperação de informações na região hipocampal: a ativação dos receptores tipo I favorece o processamento de informações pela memória e a ativação de receptores tipo II prejudica esse processo (JEANSOK, DIAMOND, 2002; MCEWEN, SAPOLSKY, 1995). Os efeitos nocivos do estresse sobre o hipocampo parecem ser mediados, em grande parte, por uma menor atividade de receptores glicocorticóides, que se tornam sobrecarregados com corticosteróides, em resposta ao estresse (JEANSOK, DIAMOND, 2002). Os corticosteróides são os principais glicocorticóides sintetizados pelo córtex adrenal e secretados em resposta ao estresse (cortisol em humanos e corticosterona em ratos). No hipocampo de ratos, a ligação de corticosterona aos receptores glicocorticóides afeta negativamente o metabolismo e a morfologia neuronal (JEANSOK, DIAMOND, 2002; MCEWEN, SAPOLSKY, 1995).

Estressores físicos e psicológicos induzem a secreção de catecolaminas (dopamina, epinefrina e norepinefrina) e de glicocorticóides pela glândula adrenal. As taxas de secreção desses neurotransmissores variam de acordo com a intensidade do estresse ao qual se é exposto. Apesar disso, não há um padrão consistente de ativação de catecolaminas e glicocorticóides em resposta ao estresse (MCEWEN, SAPOLSKY, 1995). As catecolaminas são secretadas e disparam cascatas de segundos mensageiros na membrana pós-sináptica em poucos segundos; os glicocorticóides são secretados numa latência de minutos e seus efeitos podem levar horas para emergir, pois envolvem eventos transcricionais (MCEWEN, SAPOLSKY, 1995).

Concentrações excessivas dessas catecolaminas prejudicam a formação da memória, contudo, esses neurotransmissores estão envolvidos no metabolismo da glicose no encéfalo e

níveis ideais de glicose circulante estão relacionados à facilitação dos processos de memória (MCEWEN, SAPOLSKY, 1995). Por outro lado, os glicocorticóides inibem o transporte de glicose no encéfalo e, de modo mais seletivo, no hipocampo. Essa inibição, e conseqüente redução da glicose no hipocampo, não é suficiente para reduzir os níveis basais de adenosina tri-fosfato (ATP) nos neurônios hipocampais ou células glia. Todavia, em períodos de elevada demanda energética, os glicocorticóides aceleram a perda de ATP. Um evento altamente plástico, como é o caso da potencialização de longo prazo (*Long-term potentiation* – LTP), demanda um alto valor energético (dos neurônios) e a perda acelerada de ATP (induzida pela ação dos glicocorticóides) pode prejudicar a acurácia da LTP, ocasionando comprometimentos na capacidade de memória (MCEWEN, SAPOLSKY, 1995).

A LTP consiste em um aumento da eficácia sináptica que é produzido por uma breve estimulação tetânica de fibras aferentes excitatórias (IZQUIERDO, 2002). A ativação de receptores tipo I (que ocorre quando os níveis de corticosteróides estão entre baixos e intermediários) aumenta a magnitude da LTP, enquanto que a ativação de receptores tipo II (que ocorre em níveis altos de corticosteróides – situações de estresse) atenua a LTP e aumenta a depressão de longo prazo (*Long-term depression* – LTD), um processo oposto à LTP, que resulta em uma diminuição da eficácia sináptica (JEANSOK, DIAMOND, 2002; MCEWEN, DIAMOND, 1995). Diferentes tipos de estresse prejudicam também a *primed-burst potentiation* (PBP), uma forma de LTP de menor limiar e mais sensível à modulação por drogas, neurotransmissores, hormônios e pelos efeitos deletérios do envelhecimento (JEANSOK, DIAMOND, 2002).

Além dos efeitos dos glicocorticóides sobre a LTP e a PBP, eles apresentam um efeito bem caracterizado na eletrofisiologia hipocampal: níveis elevados desses hormônios produzem uma redução da excitabilidade (efeito inibitório) e níveis basais apresentam efeitos excitatórios (JEANSOK, DIAMOND, 2002; MCEWEN, SAPOLSKY, 1995). Esses efeitos

não são permanentes e a modulação da função hipocampal pelo estresse envolve um processo dinâmico que está sob contínua influência da percepção do animal acerca dos estímulos ambientais (JEANSOK, DIAMOND, 2002).

Existem evidências que sugerem o envolvimento direto de outros neurotransmissores nos processos adaptativos de resposta ao estresse (JEANSOK, DIAMOND, 2002; MCEWEN, SAPOLSKY, 1995; MCEWEN, 2000). Neurotransmissores opióides, serotonérgicos e glutamatérgicos parecem estar envolvidos na mediação dos efeitos do estresse sobre a plasticidade sináptica. Níveis elevados de neurotransmissores opióides e serotonérgicos exercem um efeito inibitório na LTP e de supressão sobre a plasticidade sináptica, comprometendo os processos de formação da memória (JEANSOK, DIAMOND, 2002). A neurotransmissão serotoninérgica parece ser sensível a diferentes tipos de estresse e está associada aos processos de adaptação a eventos aversivos; a ativação de receptores serotonérgicos 5-HT_{1A} parece estar relacionada a uma diminuição das respostas comportamentais a eventos ameaçadores (JOCA et al., 2003; PADOVAN et al., 2000; QUEVEDO et al., 2003). O estresse promove aumento na liberação de L-glutamato (principal neurotransmissor excitatório do SNC) no hipocampo e esse neurotransmissor parece agir de forma sinérgica com os glicocorticóides (JOCA et al., 2003).

Em animais desnutridos, muitos sistemas de neurotransmissão encontram-se alterados (ALMEIDA et al., 1996) e, por conseqüência disso, o comportamento responsivo e o julgamento de situações de risco podem estar comprometidos. Acredita-se que, por esse motivo, comumente o estresse represente um fator agravante dos efeitos produzidos pela desnutrição no SNC (ARRUDA, ARRUDA, 1994; BARROS, 1993; CARVALHAES, BENÍCIO, 2002; DURÁN et al., 2006; FALBO, ALVES, 2002; FRANÇOLIN-SILVA, ALMEIDA, 2004).

Apesar de existirem diversos estudos que investigam os efeitos do estresse no comportamento animal e outros tantos que exploram as relações entre desnutrição e aprendizagem, são ainda escassos aqueles que analisam a associação entre estresse agudo e desnutrição em modelos animais de aprendizagem e memória.

Muitos estudos utilizam a imobilização como procedimento de estresse agudo, por ser considerada um forte estressor quanto às alterações que provoca, principalmente as fisiológicas e comportamentais (DRONJAK et al., 2004; PADOVAN et al., 2000; ROSA et al., 2005). Outros procedimentos também são utilizados para provocar estresse em modelos experimentais animais, tais como exposição ao frio, nado forçado, estímulo sensorial aversivo, presença de predador e novidade (presença de um material desconhecido no ambiente) (DE OLIVEIRA et al., 2004; DRONJAK et al., 2004; FRANÇOLIN-SILVA, ALMEIDA, 2004; MAISONNETTE et al., 1993; PADOVAN et al., 2000; ROSA et al., 2005).

Estudos sobre transtornos mentais em humanos e em modelos de experimentação animal demonstram que o SNC possui uma alta capacidade adaptativa (plasticidade), mas é bastante vulnerável aos danos produzidos por alterações ambientais, tais como insultos nutricionais, principalmente quando estes ocorrem nas fases iniciais e/ou críticas do desenvolvimento orgânico (BEDI, 1987; GEORGIEFF, 2007; MORGANE et al., 1993; MORGANE et al., 2002), e experiências traumáticas ou situações de estresse (JEANSOK, DIAMOND, 2002; MCEWEN, SAPOLSKY, 1995; MCEWEN, 2000).

A desnutrição e o estresse geralmente coexistem em populações humanas e constituem fatores sociais preocupantes que levam a prejuízos significativos da função cognitiva e a alterações fisiológicas e comportamentais. Em muitos casos, os efeitos dessa interação entre estresse e desnutrição vão além dos prejuízos cognitivos e comportamentais, resultando em

um quadro de doença mais amplo, com implicações sérias sobre a capacidade produtiva dos indivíduos e, conseqüentemente, sobre a qualidade e a expectativa de vida.

Os efeitos deletérios da desnutrição protéica precoce e da exposição ao estresse intenso, breve ou duradouro, sobre o SNC são muito parecidos em ratos e humanos, dada a semelhança entre as estruturas neurais das duas espécies. Por esse motivo, tanto por razões éticas quanto pela possibilidade de se ter um controle maior sobre as variáveis ambientais, a utilização de modelos de experimentação animal permite a realização de uma análise mais criteriosa acerca das conseqüências da interação entre desnutrição e estresse sobre o comportamento e, conseqüentemente, sobre os processos de aprendizagem e memória.

2. Objetivos

Geral

O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos do estresse agudo, associado à desnutrição protéica imposta no início da vida, sobre os processos de aprendizagem e memória de ratos, no labirinto aquático de Morris.

Específicos

- 1.** Analisar o desempenho de cada grupo experimental na tarefa de aprendizagem e memória espacial do MWM, e comparar esse desempenho entre animais estressados e não estressados de um mesmo grupo nutricional, e entre animais controles (bem nutridos) e desnutridos sob a mesma condição de estresse.
- 2.** Analisar a precisão de navegação desses animais em busca da plataforma na *probe trial*.
- 3.** Investigar os efeitos do estresse agudo, associado à desnutrição protéica precoce, sobre o processo de consolidação da memória e sobre a recuperação das informações anteriormente processadas, na tentativa de reteste realizada 28 dias após a primeira etapa.

3. Material e Método

3.1 Sujeitos

No presente trabalho foram utilizados 102 ratos albinos, machos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Estes animais foram recebidos no dia do nascimento e transportados ao biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento, onde foram alojados e tratados até o período de testes.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto, por estar de acordo com os princípios éticos estabelecidos por essa comissão para experimentação animal (Protocolo nº 06.1.1439.53.4).

3.2 Composição das ninhadas

Cada ninhada foi composta pela rata-mãe, seis filhotes machos e duas fêmeas.

As ratas-mães foram tratadas previamente, no Biotério Central do Campus, com dieta comercial balanceada.

A formação das ninhadas foi aleatória, a fim de se evitar que somente filhotes provenientes de uma mesma rata-mãe compusessem as ninhadas. Posteriormente, as ninhadas foram designadas aleatoriamente para receber dietas isocalóricas contendo 16% (grupo controle) ou 6% de proteína (grupo desnutrido) durante toda a fase de lactação. Os pesos das ratas-mães e respectivas ninhadas foram registrados no dia 0 (dia de nascimento dos filhotes) e aos 7, 14 e 21 dias de vida dos filhotes.

3.3 Alojamento e Manutenção dos Animais

Durante a fase de lactação (0 aos 21 dias), as ninhadas foram alojadas em caixas de polietileno (41 x 34 x 16 cm), forradas com raspas de madeira (maravalha), com tampa

gradeada de aço inoxidável, comedouro e bebedouro de vidro. Nesta fase, as ratas-mães foram alimentadas com dieta balanceada de 16 % de proteína (grupo controle) ou dieta experimental de 6% de proteína (grupo desnutrido). A maravalha foi trocada semanalmente. A comida e a água foram trocadas diariamente.

Aos 21 dias foi realizado o desmame – separação dos filhotes das ratas-mães (descartadas a partir desta data, assim como os filhotes fêmeas). Foram utilizados apenas ratos machos, pois as fêmeas apresentam ciclo estral, uma variável que se decidiu excluir, por conta da instabilidade hormonal e comportamental.

Durante a fase de pós-lactação (dos 21 aos 49 dias de vida) os filhotes foram alojados em grupos – dois animais por caixa (do mesmo material e tamanho já citados). A maravalha foi trocada duas vezes por semana.

Nas fases de lactação e pós-lactação, o grupo controle recebeu dieta balanceada (16% de proteína) e o grupo desnutrido recebeu dieta experimental (6% de proteína). Após esse período (os primeiros 49 dias), todos os animais receberam dieta comercial. Foram testados 52 animais no Experimento I e 50 animais no Experimento II. A alimentação referente a cada período de vida dos animais está representada na Tabela 1.

Tabela 1: Alimentação referente a cada período de vida dos animais.

PERÍODO	GRUPO CONTROLE (n = 54)	GRUPO DESNUTRIDO (n = 48)
LACTAÇÃO (NASCIMENTO ATÉ 21 DIAS DE VIDA)	DIETA BALANCEADA (16% DE PROTEÍNA)	DIETA EXPERIMENTAL (6% DE PROTEÍNA)
PÓS-LACTAÇÃO (DE 21 ATÉ 49 DIAS DE VIDA)	DIETA BALANCEADA (16% DE PROTEÍNA)	DIETA EXPERIMENTAL (6% DE PROTEÍNA)
RECUPERAÇÃO (DE 49 DIAS DE VIDA ATÉ PERÍODO DE TESTES)	RAÇÃO COMERCIAL	RAÇÃO COMERCIAL

As dietas utilizadas na alimentação dos animais nas fases de lactação e pós-lactação foram preparadas de acordo com Barnes *et al.* (1968) com algumas modificações conforme descrito por Santucci *et al.* (1994), baseadas nas recomendações da dieta para roedores AIN-93G

(Reeves, 1993). O percentual de nutrientes da dieta oferecida ao grupo controle (16% de proteína) e ao grupo desnutrido (6% de proteína), durante as fases de lactação e pós-lactação, está representado na Tabela 2.

Tabela 2: Composição das dietas controle (16% de proteína) e experimental (6% de proteína) em (%).

COMPONENTES	CONTROLE (%)	EXPERIMENTAL (%)
PROTEÍNA (CASEÍNA)	16	6
METIONINA	0,032	0,012
CARBOIDRATO (AMIDO)	69,768	79,788
GORDURA (ÓLEO VEGETAL)	8	8
MISTURA SALINA	5	5
MISTURA VITAMÍNICA	1	1
COLINA	0,2	0,2
TOTAL	100	100

Fornecedores: Caseína, Mistura Salina, Mistura Vitamínica, Colina: Rhoster, Ind. e Com. Ltda, Brasil; Metionina: Dyets, USA; Gordura: Óleo de Milho (Mazola ® Refinarias de Milho Brasil); Carboidrato: Amido de Milho (Maisena ® Refinarias de Milho Brasil);

Dos 50 dias de idade até o final dos testes todos os animais receberam dieta comercial para laboratório (ração NUVILAB CR-1 para camundongos e ratos), fabricada pela Nuvital Nutrientes Ltda. – Colombo, PR; baseada em recomendações do Instituto *Research Council e National Institute of Health* - USA. Esse foi o período de recuperação nutricional para os animais desnutridos. Após o desmame, o peso dos animais foi registrado aos 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 e 98 dias de vida.

Durante todo o experimento foi fornecido alimento e água aos animais, sem restrições.

O biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento teve a temperatura controlada ($23^{\circ} \text{C} \pm 1$), e a iluminação artificial programada para ciclos de claro/escuro com duração de 12 horas cada um. O período claro foi programado para início às 6h00.

3.4 Grupos de animais

Os animais foram divididos em 4 grupos no Experimento I e 4 grupos no Experimento II, de acordo com a condição nutricional nas fases de lactação e pós-lactação e a exposição ao estresse. O delineamento experimental está demonstrado nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Grupos de animais do Experimento I (n = 52).

GRUPOS* (n)	CONDIÇÃO NUTRICIONAL	ESTRESSE
C (14)	CONTROLE (dieta com 16% de proteína)	NÃO ESTRESSADOS
CE (14)	CONTROLE (dieta com 16% de proteína)	ESTRESSADOS (24h antes do início dos testes)
D (12)	DESNUTRIDO (dieta com 6% de proteína)	NÃO ESTRESSADOS
DE (12)	DESNUTRIDO (dieta com 6% de proteína)	ESTRESSADOS (24h antes do início dos testes)

* C: condição nutricional, grupos que receberam a dieta controle (16% de proteína); D: condição nutricional, grupos que receberam a dieta experimental (6% de proteína); E: exposição ao estresse.

Tabela 4: Grupos de animais do Experimento II (n = 50).

GRUPOS* (n)	CONDIÇÃO NUTRICIONAL	ESTRESSE
C (14)	CONTROLE (dieta com 16% de proteína)	NÃO ESTRESSADOS
CE (12)	CONTROLE (dieta com 16% de proteína)	ESTRESSADOS (após última tentativa de cada dia de testes)
D (12)	DESNUTRIDO (dieta com 6% de proteína)	NÃO ESTRESSADOS
DE (12)	DESNUTRIDO (dieta com 6% de proteína)	ESTRESSADOS (após última tentativa de cada dia de testes)

* C: condição nutricional, grupos que receberam a dieta controle (16% de proteína); D: condição nutricional, grupos que receberam a dieta experimental (6% de proteína); E: exposição ao estresse.

3.5 Equipamento de teste

Foi utilizado um labirinto aquático semelhante ao modelo descrito por Morris, em 1981. O labirinto aquático consistiu em um tanque circular de fibra de vidro, de cor branca, com 150 cm de diâmetro e 39 cm de altura, preenchido com água a uma temperatura controlada de 25° C ($\pm 1^\circ\text{C}$). O tanque foi dividido em quatro quadrantes imaginários (para efeito de registros comportamentais) numerados em sentido horário (quadrante 1, 2, 3 e 4). Uma plataforma circular de 12 cm de diâmetro e 25 cm de altura foi colocada dentro do tanque numa posição fixa no centro de um dos quatro quadrantes imaginários (quadrante 1). A distância do nível da água até a borda superior do labirinto é de 12,5 cm. Foi adicionado leite (2 litros) para tornar a água opaca e ocultar a plataforma que fica submersa 1,5 cm abaixo do nível da água.

O labirinto aquático foi colocado no centro de uma sala. Em áreas externas ao tanque foram oferecidas pistas visuais como figuras na parede, janelas e porta, que serviram como

pistas distais no aprendizado dos animais. Não foram oferecidas pistas visuais proximais, nem pistas olfativas ou auditivas.

Acima do labirinto foi fixada uma câmera de vídeo (AS-3 Tracker, San Diego – USA) conectada a um sistema de vídeo (LG – BRA) e monitor (LG – BRA), localizados em uma sala adjacente, com a finalidade de registrar e monitorar as sessões experimentais.

Para o procedimento de estresse foi utilizado um material semelhante ao descrito por Rosa e colaboradores (2005). Os imobilizadores foram confeccionados em aço inoxidável, em dois tamanhos (22 x 7,5 x 6 cm para animais do grupo nutricional controle e 20 x 6,5 x 5 cm para animais do grupo desnutrido), com base plana e parte superior convexa e ajustável. Os imobilizadores possuem orifícios na base, na parte superior e nas extremidades e uma pequena abertura lateral. A principal finalidade desses orifícios é possibilitar a entrada e saída de ar para que o animal possa respirar. Os orifícios da base, especificamente, possibilitam a passagem de urina e fezes que o animal costuma excretar quando submetido a situações de estresse e ansiedade. A abertura lateral tem como finalidade permitir que o rabo do animal fique livre.

3.6 Procedimento de imobilização

Até os 70 dias de vida, os animais foram classificados apenas quanto à condição nutricional: animais bem nutridos (Grupo controle) e animais desnutridos (Grupo desnutrido). Os animais foram designados para compor os grupos CE e DE aleatoriamente, em cada um dos dois experimentos.

No Experimento I, os animais dos grupos CE e DE foram submetidos ao procedimento de estresse, aos 70 dias de vida. Eles foram colocados no imobilizador onde permaneceram durante um período de 2 horas. Depois do período de imobilização, os animais foram retirados do imobilizador, devolvidos à caixa e levados de volta ao biotério, onde

permaneceram por 24 horas, até o início da sessão experimental. Esses animais foram submetidos ao procedimento de estresse por imobilização uma única vez.

No Experimento II, os animais dos grupos CE e DE foram submetidos ao procedimento de estresse, imediatamente após a última tentativa (12^a) do primeiro dia de testes na tarefa de aprendizagem no labirinto aquático de Morris e, novamente, após a última tentativa (*probe trial* – 25^a tentativa) do segundo dia de testes no labirinto aquático. Após a última tentativa de cada dia de testes, os animais desses dois grupos foram retirados do tanque, enxugados com um pano de algodão limpo e seco e colocados no imobilizador, onde permaneceram durante um período de duas horas. Depois do período de imobilização (duas horas), os animais foram retirados do imobilizador, devolvidos à caixa e levados de volta ao biotério. A primeira etapa de testes, em ambos os experimentos, foi realizada em dois dias consecutivos, sendo 12 tentativas no primeiro dia e 12 tentativas mais a *probe trial* no segundo dia. Após 28 dias do segundo dia de testes, os animais foram colocados mais uma vez no labirinto aquático para a realização do reteste (2^a etapa do experimento – composta por uma única tentativa).

Em ambos os experimentos, a disposição dos grupos foi aleatória. Uma vez que os animais foram alojados em duplas, o estresse foi sempre imposto aos dois animais de uma mesma caixa, não havendo duplas em que um animal foi submetido ao estresse e o outro não. No período em que ficaram imobilizados, os animais dos grupos CE e DE, dos Experimentos I e II, foram colocados em uma sala adjacente ao biotério. Esta sala permanece com a porta fechada (para evitar ruídos externos) e a luz acesa (com iluminação igual à do biotério).

3.7 Experimento I

Neste experimento, os animais foram testados na tarefa de aprendizagem 24 horas após terem sido submetidos ao estresse por imobilização. Antes da primeira tentativa do primeiro dia de testes, cada animal foi colocado na plataforma durante 60 segundos. Após esse

intervalo de tempo o animal era posicionado de costas para o centro do tanque, em um dos quadrantes – à exceção daquele onde permanecia a plataforma – e era permitido a ele nadar em busca da plataforma de fuga por um período de 60 segundos. A plataforma permaneceu na mesma localização durante todo o experimento.

Foram realizadas 12 tentativas diárias durante dois dias consecutivos. Nas ocasiões em que um animal não conseguia alcançar a plataforma dentro do tempo estabelecido, o experimentador o retirava da água colocando-o sobre a plataforma. Entre as tentativas, cada animal permaneceu sobre a plataforma por um intervalo de 35 segundos. As posições em que eles foram colocados em cada tentativa foram determinadas aleatoriamente em proporções iguais.

Após a última tentativa do segundo dia de testes, a plataforma era removida e o animal colocado no quadrante diagonalmente oposto àquele que continha a plataforma e era imposto um período de 60 segundos de natação (*probe trial* – 25ª tentativa). Foi registrado o tempo despendido e analisado o percentual de permanência em cada quadrante. A *probe trial* possibilita analisar a precisão com que o animal busca a plataforma e, conseqüentemente, a efetivação do aprendizado da tarefa.

Depois de 28 dias do término desta fase de testes, cada animal foi novamente testado em uma única tentativa (reteste - 26ª tentativa). Os animais foram colocados no labirinto aquático, no quadrante diagonalmente oposto àquele em que estava fixada a plataforma. Nesta tentativa, cada animal teve 180 segundos para encontrar a plataforma submersa que estava na mesma localização em que permaneceu durante todo o experimento. Antes dessa 26ª tentativa os animais não foram submetidos a estresse.

3.8 Experimento II

Neste experimento, os animais foram imobilizados imediatamente após a última tentativa do primeiro e segundo dia de testes. O tempo de imobilização e o equipamento foram os mesmos utilizados no primeiro experimento, como já descrito no Material e Método.

Os testes também foram realizados em dois dias, totalizando 24 tentativas mais a *probe trial* (25ª tentativa) e esses animais foram testados mais uma única vez após 28 dias do final desta fase, realizando a 26ª tentativa (reteste).

Em ambos os experimentos, essa tentativa de reteste foi realizada para que se pudesse avaliar a consolidação da memória e a capacidade do animal em recuperar e reutilizar as informações processadas na primeira etapa de testes, no labirinto aquático.

3.9 Análise dos dados

Os dados de peso corporal dos animais foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores (dieta x dia) com repetição no fator dia.

Os dados comportamentais (latência de fuga dos animais em cada tentativa) foram submetidos a uma ANOVA de três fatores (dieta x estresse x tentativa), com repetição no fator tentativa. Posteriormente, utilizou-se uma ANOVA de dois fatores (dieta x tentativa) entre animais desnutridos e controles sob a mesma condição de estresse e (estresse x tentativa) entre animais estressados e não estressados de um mesmo grupo nutricional, com repetição no fator tentativa em ambas as condições. Para análise estatística da *probe trial* aplicou-se uma ANOVA de três fatores (dieta x estresse x quadrante) com repetição no fator quadrante.

Nas duas análises, quando apropriado, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

Utilizou-se o mesmo procedimento de análise estatística em ambos os experimentos.

4. Resultados

4.1 Peso corporal

A análise de peso corporal revelou uma diferença acentuada entre os grupos desnutrido e controle, com valores significativamente menores do desnutrido durante as medidas realizadas desde o período de lactação até o final dos testes. Os animais desnutridos tiveram um ganho de peso significativo no período de recuperação nutricional. Entretanto, a recuperação não foi suficiente para reverter o déficit de crescimento provocado pela desnutrição.

A análise dos dados estatísticos referentes à perda de peso das ratas-mães demonstrou haver uma perda de peso significativamente maior das ratas desnutridas em relação às bem nutridas (controles). A ANOVA revelou efeito significativo do fator dieta [$F_{1,40} = 183,8$; $p < 0,05$], do fator intervalo [$F_{2,80} = 5,5$; $p < 0,05$] e de interação entre os fatores dieta x intervalo [$F_{2,80} = 19,2$; $p < 0,05$], como demonstrado na Figura 1. A análise de comparações múltiplas mostrou uma diferença significativa entre a perda de peso das ratas desnutridas e bem nutridas, nas três semanas de lactação ($p < 0,05$). Entre as ratas do grupo controle, não houve diferença significativa de perda de peso. E entre as ratas desnutridas, houve diferença significativa na perda de peso entre a primeira e terceira semana e entre a segunda e terceira semanas.

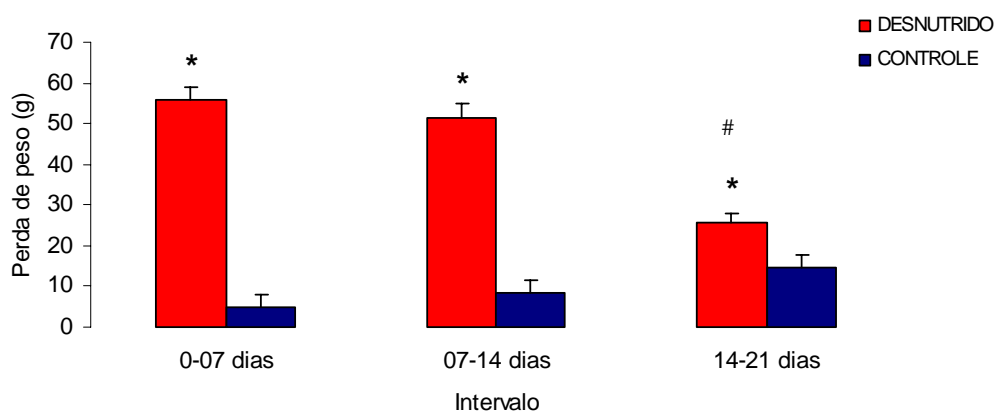


Figura 1 - Perda de peso corporal das ratas-mães (Média \pm EPM) dos dois grupos nutricionais durante o período de lactação. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, no mesmo dia; # $p < 0,05$ comparado ao grupo desnutrido na primeira e na segunda semana, ambos de acordo com o teste *Post Hoc* de Newman-Keuls.

Em relação ao peso das ninhadas na fase de lactação, houve diferenças significativas desses valores entre animais desnutridos e bem nutridos. A análise estatística (ANOVA) revelou efeito significativo do fator dieta [$F_{1,41} = 336,3$; $p < 0,05$], do fator dia [$F_{3,123} = 771,1$; $p < 0,05$] e de interação entre os fatores dieta x dia [$F_{3,123} = 327,1$; $p < 0,05$], como demonstrado na Figura 2. A análise de comparações múltiplas mostrou uma diferença significativa de peso entre as ninhadas desnutridas e bem nutridas, com valores menores das bem nutridas nos dias 7, 14 e 21 ($p < 0,05$). A análise de comparações múltiplas também revelou que no decorrer do período de lactação o peso dos animais das ninhadas bem nutridas teve um aumento significativo em cada uma das três semanas (0-7, 7-14 e 14-21 dias de vida). Os animais das ninhadas desnutridas apresentaram aumento de peso significativo apenas na primeira e na segunda semana do período de lactação (0-7 e 7-14 dias de vida).

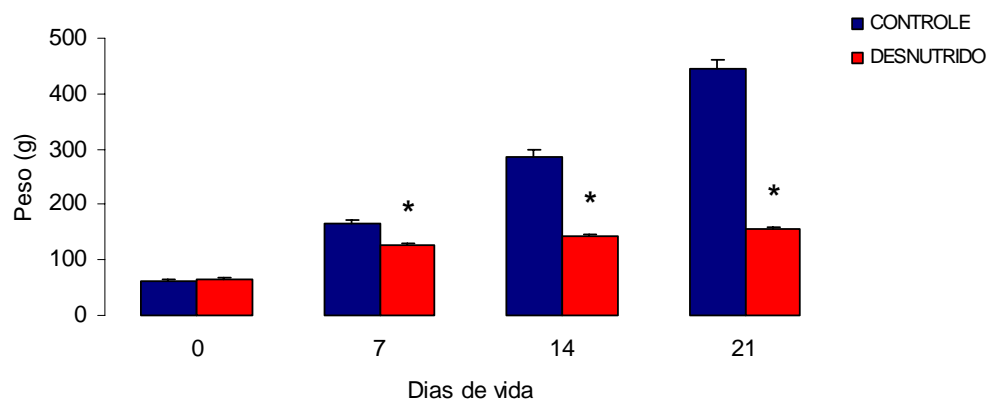


Figura 2 - Peso das ninhadas (Média \pm EPM) do grupo controle e do grupo desnutrido durante o período de lactação. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, no mesmo dia, de acordo com o teste *Post Hoc* de Newman-Keuls.

Com relação ao peso dos ratos no período de pós-lactação, o peso dos desnutridos permaneceu significativamente menor, comparados aos bem nutridos. A diferença de peso corporal foi acentuada no período de pós-lactação – sobretudo dos 28 aos 49 dias de vida – e perdurou durante o período de recuperação nutricional até o fim dos testes aos 98 dias de vida. A análise estatística (ANOVA) revelou efeito significativo do fator dieta [$F_{1,107} = 751,2$; $p < 0,05$], do fator dia [$F_{7,749} = 3451,8$; $p < 0,05$] e de interação entre os fatores dieta x dia [$F_{7,749} = 245,8$; $p < 0,05$], como demonstrado na Figura 3. A análise de comparações múltiplas mostrou que a diferença de peso corporal entre os grupos controle e desnutrido foi significativa e que desnutridos apresentaram pesos menores desde a primeira semana do período de pós-lactação (aos 28 dias) e durante todo o período de recuperação nutricional até o fim dos testes (aos 98 dias de vida); $p < 0,05$.

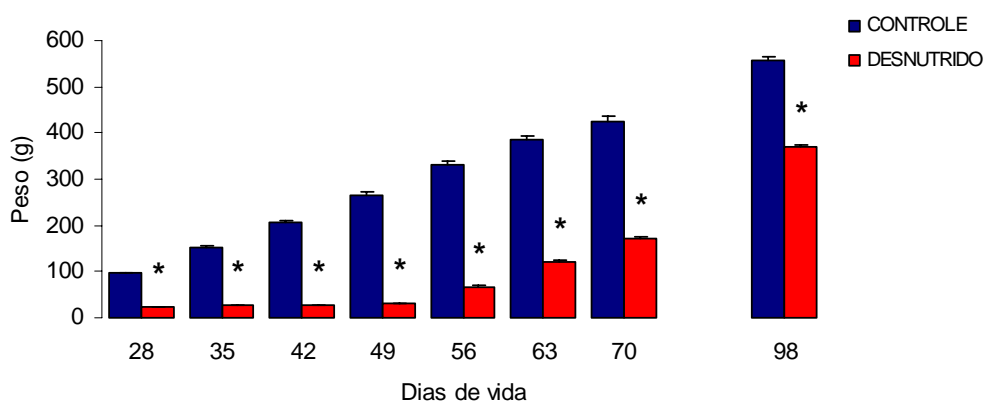


Figura 3 - Peso dos filhotes durante o período de pós-lactação. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, no mesmo dia, de acordo com o teste *Post Hoc* de *Newman-Keuls*.

4.2 Experimento I

Os dados de latência obtidos nos 4 grupos experimentais foram submetidos a análise estatística (ANOVA de três fatores) que revelou efeito significativo do fator dieta [$F_{1,48} = 5,1$; $p < 0,05$], do fator tentativa [$F_{23,1104} = 9,4$; $p < 0,05$] e de interação entre os fatores dieta x estresse [$F_{1,48} = 9,7$; $p < 0,05$]. A ANOVA não mostrou efeito significativo do fator estresse (Figura 4). A análise de comparações múltiplas mostrou que animais desnutridos submetidos ao estresse (DE) apresentaram latências menores que animais desnutridos não estressados (D). Animais controles submetidos ao estresse (CE) não apresentaram diferenças de desempenho quando comparados aos animais controles não estressados (C). A análise de comparações múltiplas também mostrou que não houve diferenças de desempenho entre os animais do grupo controle não estressado (C) e os animais do grupo desnutrido estressado (DE).

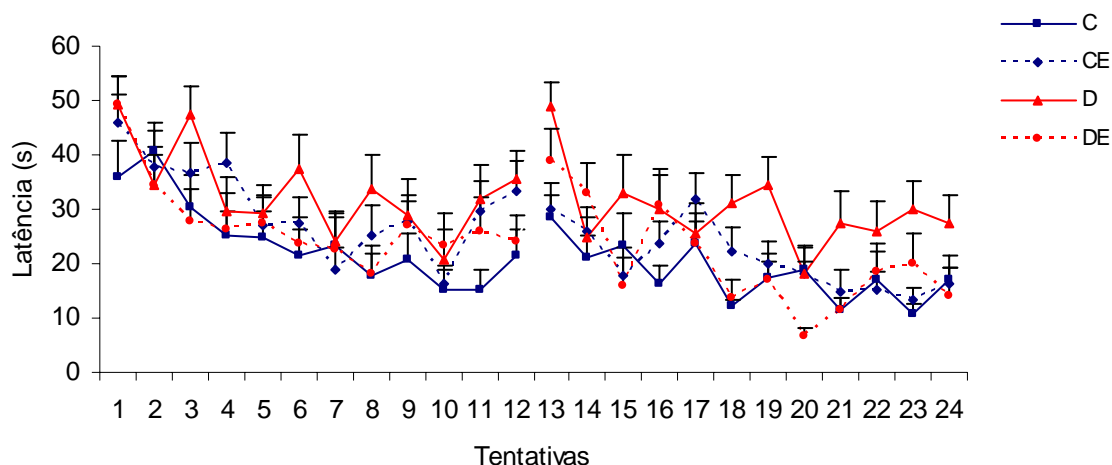


Figura 4 - Latência de fuga (Média \pm EPM) dos animais dos 4 grupos experimentais, C (n=14), CE (n=14), D (n=12), DE(n=12), nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris. C: condição nutricional, grupos que receberam a dieta controle (16% de proteína); D: condição nutricional, grupos que receberam a dieta experimental (6% de proteína); E: exposição ao estresse.

Para uma análise mais detalhada dos efeitos da variável estresse sobre as latências de fuga de animais do mesmo grupo nutricional e dos efeitos da variável dieta entre animais dos grupos controle e desnutrido, estressados e não estressados foi utilizada uma análise estatística (ANOVA de dois fatores) entre grupos.

A ANOVA dos grupos D e DE revelou efeito significativo do fator estresse [$F_{1,22} = 6,1$; $p < 0,05$] e do fator tentativa [$F_{23,506} = 4,6$; $p < 0,05$]. Os animais do grupo DE apresentaram latências menores (Figura 5). Isso demonstra que, embora ambos os grupos diminuam suas latências ao fim das 24 tentativas, animais desnutridos quando submetidos ao estresse apresentaram latências menores que animais desnutridos não estressados. A ANOVA não revelou efeito significativo de interação entre os fatores estresse x tentativa.

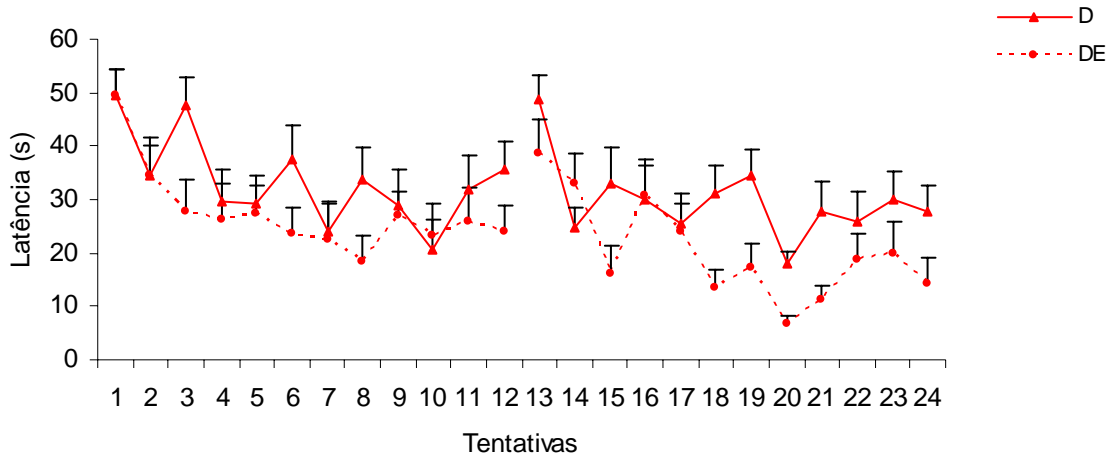


Figura 5 - Latência de fuga (Média \pm EPM) dos animais dos grupos D (n=12) e DE (n=12), nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris.

Os dados da ANOVA dos grupos C e CE não mostraram efeitos significativos do fator estresse. Houve efeito significativo apenas do fator tentativa [$F_{23,598} = 6,0$; $p < 0,05$] (Figura 6). Esses dados indicam que não houve efeito significativo do estresse em animais do grupo nutricional controle. Ambos os grupos, C e CE, diminuem suas latências ao longo das tentativas sem diferenças significativas entre eles.

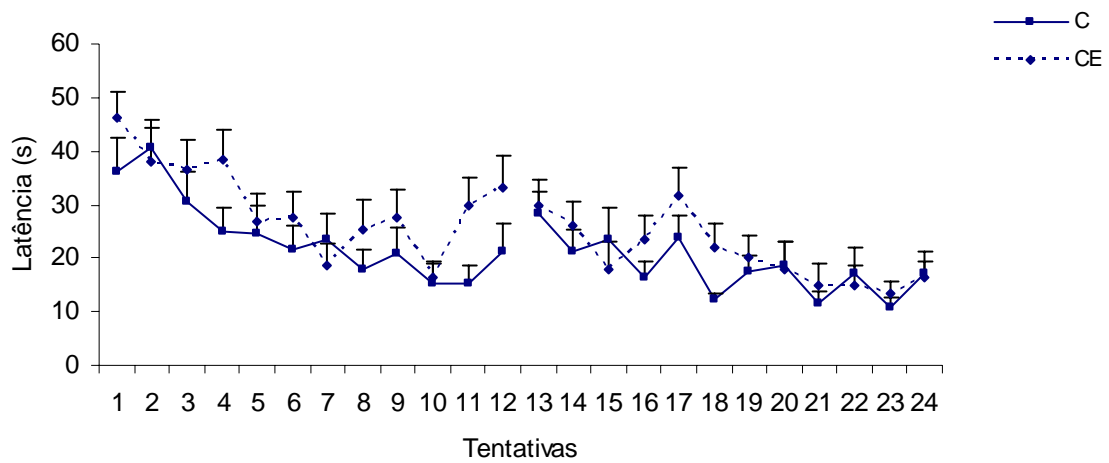


Figura 6 - Latência de fuga (Média \pm EPM) dos animais dos grupos C (n=14) e CE (n=14), nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris.

Com relação aos grupos C e D, a ANOVA mostrou efeito significativo do fator dieta [$F_{1,24} = 10,2$; $p < 0,05$] e do fator tentativa [$F_{23,552} = 4,4$; $p < 0,05$]. Os animais do grupo D apresentaram latências maiores em relação aos animais do grupo C. A ANOVA não revelou efeito significativo de interação entre os fatores dieta x tentativa (Figura 7).

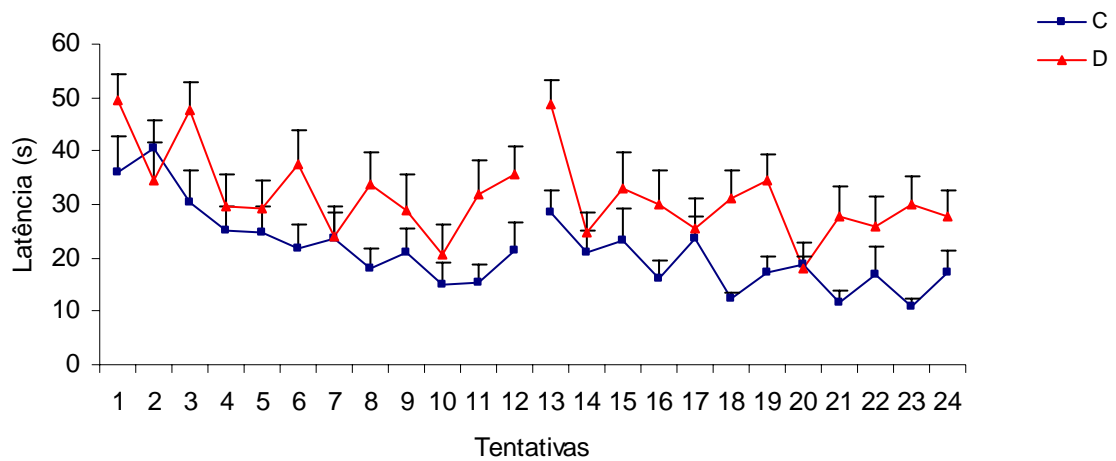


Figura 7 - Latência de fuga (Média \pm EPM) dos animais dos grupos C (n=14) e D (n=12), nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris.

A ANOVA dos grupos CE e DE revelou efeito significativo apenas do fator tentativa [$F_{23,552} = 5,8; p < 0,05$], não havendo diferenças significativas de desempenho entre os grupos controle estressado e desnutrido estressado na tarefa de aprendizagem (Figura 8). Esses dados demonstram que animais desnutridos submetidos ao estresse apresentam latências muito próximas às apresentadas por animais controles estressados. Quando submetidos ao estresse, controles e desnutridos não apresentaram diferenças significativas de desempenho na tarefa de aprendizagem.

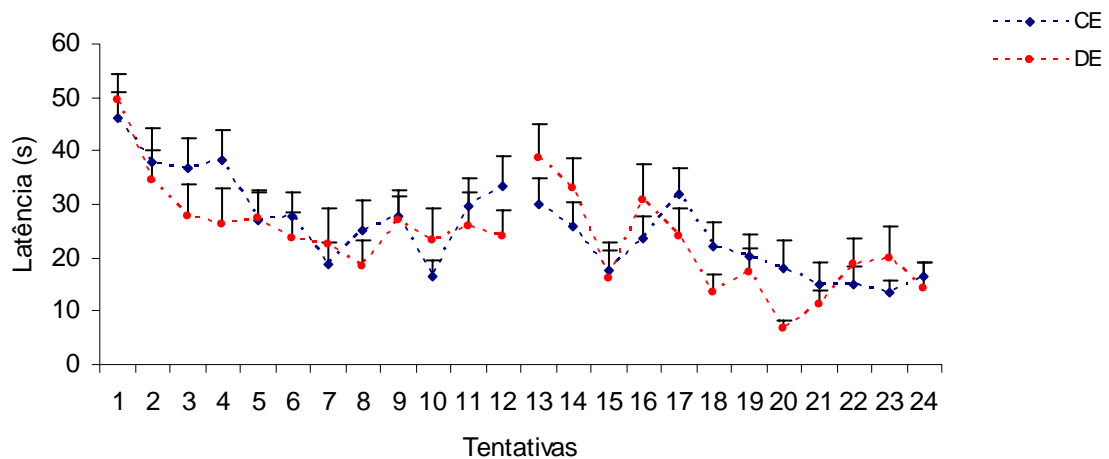


Figura 8 - Latência de fuga (Média \pm EPM) dos animais dos grupos CE (n=14) e DE (n=12), nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris.

Com relação à tentativa *probe trial*, ao fim da primeira etapa do experimento, foi realizada uma ANOVA de três fatores (dieta x estresse x quadrante). A ANOVA revelou efeito significativo do fator quadrante [$F_{3,147} = 54,5$; $p < 0,05$] e de interação entre os fatores dieta e quadrante [$F_{3,147} = 3,2$; $p < 0,05$] e entre os fatores dieta x estresse x quadrante [$F_{3,147} = 3,4$; $p < 0,05$]. A ANOVA não mostrou efeito significativo dos fatores dieta e estresse (Figura 9). A análise de comparações múltiplas mostrou que os animais do grupo D apresentaram latência significativamente menor no primeiro quadrante (QI) em relação aos demais grupos e que o tempo de permanência dos animais dos quatro grupos foi significativamente maior no primeiro quadrante (quadrante alvo) – onde anteriormente encontrava-se a plataforma – em relação ao segundo, terceiro e quarto quadrantes, indicando que houve aprendizagem em todos os grupos.

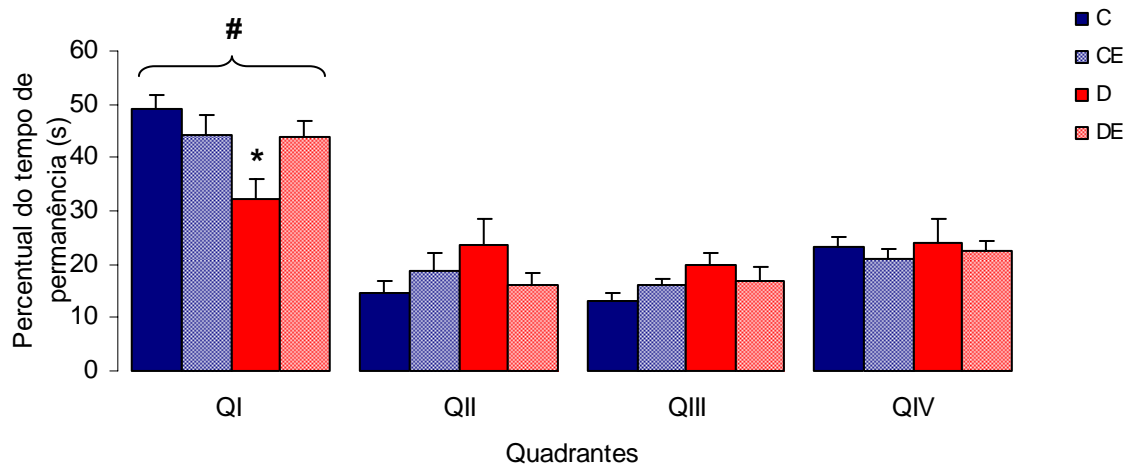


Figura 9 - Tempo de permanência (Média \pm EPM) dos animais dos 4 grupos experimentais em cada um dos 4 quadrantes imaginários do labirinto aquático de Morris, na *probe trial*. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos no primeiro quadrante (QI); # $p < 0,05$ em relação ao tempo de permanência em QII, QIII e QIV, de acordo com o teste *Post Hoc* de Newman-Keuls.

A ANOVA dos resultados referentes à segunda etapa do experimento – comparação entre a latência de fuga dos animais na 24^a tentativa (última tentativa realizada no segundo dia de testes da primeira etapa) e no reteste (26^a tentativa após 28 dias) – revelou efeito significativo do fator dieta [$F_{1,48} = 7,4$; $p < 0,05$] e do fator tentativa [$F_{1,48} = 13,3$; $p < 0,05$]. Embora a ANOVA não tenha mostrado efeito significativo de interação entre os fatores, observou-se que houve aumento considerável nas latências de animais do grupo DE na tentativa de reteste, em relação à 24^a tentativa.

Para analisar as diferenças nas latências de cada grupo, entre a 24^a tentativa e o reteste, decidiu-se submeter os dados de latência ao teste *t-student* para amostras dependentes. O teste *t-student* para amostras dependentes mostrou diferença significativa nas latências dos animais do grupo DE entre a 24^a tentativa e o reteste [$t_{(11)} = 2,59$; $p < 0,05$]. Nos demais grupos não houve diferença significativa das latências entre a 24^a tentativa e o reteste (Figura 10).

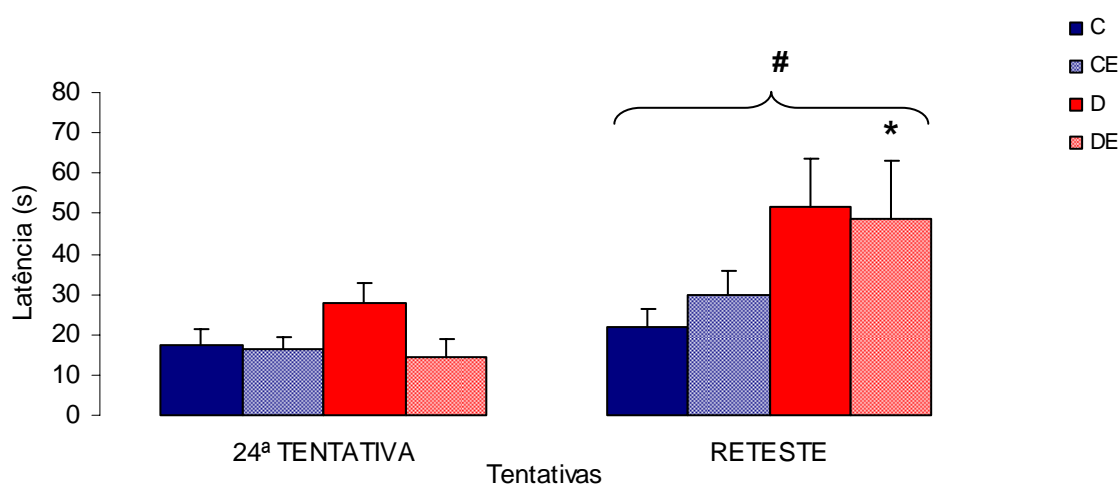


Figura 10 - Latência de fuga (Média \pm EPM) dos animais dos 4 grupos experimentais, na última tentativa da primeira etapa de testes (24^a tentativa) e após 28 dias (26^a tentativa – reteste), no labirinto aquático de Morris. # $p < 0,05$ em relação à 24^a tentativa; * $p < 0,05$ em relação à latência do mesmo grupo na 24^a tentativa, de acordo com o teste *t-student*.

4.3 Experimento II

Neste experimento, seguiu-se o mesmo procedimento de análise utilizado no primeiro experimento. Os dados de latência dos animais nos 4 grupos experimentais foram submetidos a uma ANOVA de 3 fatores e, posteriormente, utilizou-se uma ANOVA de 2 fatores entre grupos nutricionais distintos e entre grupos estressados e não estressados.

Os dados de latência obtidos foram submetidos à ANOVA de três fatores que revelou efeito significativo do fator dieta [$F_{1,46} = 12,8$; $p < 0,05$], do fator tentativa [$F_{23,1058} = 14,4$; $p < 0,05$] e de interação entre os fatores dieta x tentativa [$F_{23,1058} = 2,3$; $p < 0,05$]. A análise de comparações múltiplas mostrou que animais desnutridos apresentaram latências maiores que controles, independentemente da presença da variável estresse (Figura 11).

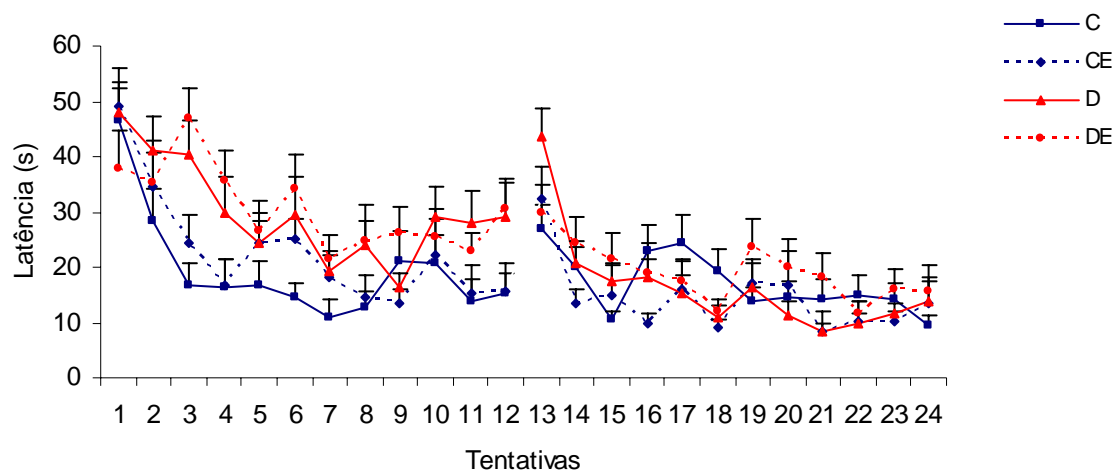


Figura 11 - Latência de fuga (Média ± EPM) dos animais dos 4 grupos experimentais, C (n=14), CE (n=12), D (n=12), DE(n=12), nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris.

A ANOVA dos grupos D e DE revelou efeito significativo do fator tentativa [$F_{23,506} = 9,1$; $p < 0,05$]. Não houve efeito significativo do fator estresse ou de interação (Figura 12). Os dados da ANOVA demonstraram que não houve efeito da variável estresse entre animais desnutridos, neste experimento.

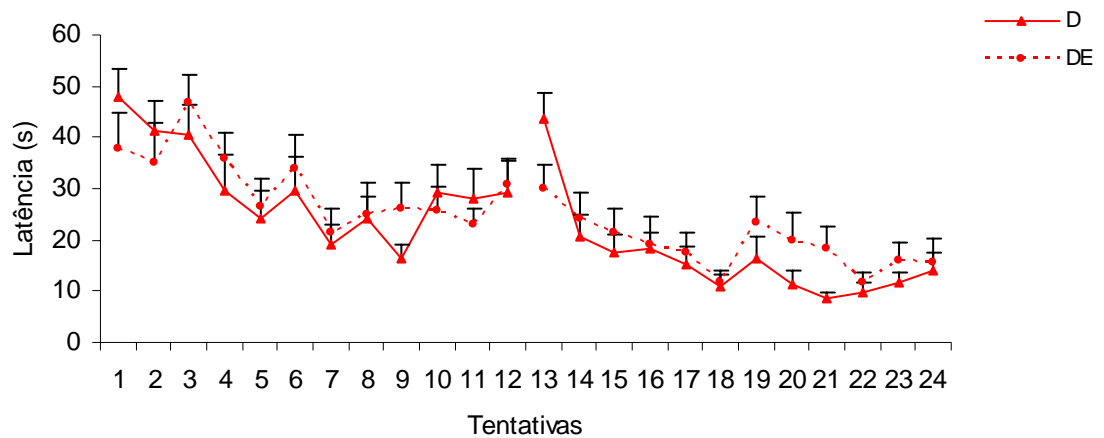


Figura 12 - Latência de fuga (Média \pm EPM) dos animais dos grupos D (n=12) e DE (n=12), nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris.

Os dados da ANOVA dos grupos C e CE revelou efeito significativo apenas do fator tentativa [$F_{23,552} = 7,4$; $p < 0,05$]. Estes dados demonstram que animais controles também não apresentaram diferenças significativas de desempenho quando submetidos ao procedimento de estresse utilizado neste segundo experimento (Figura 13).

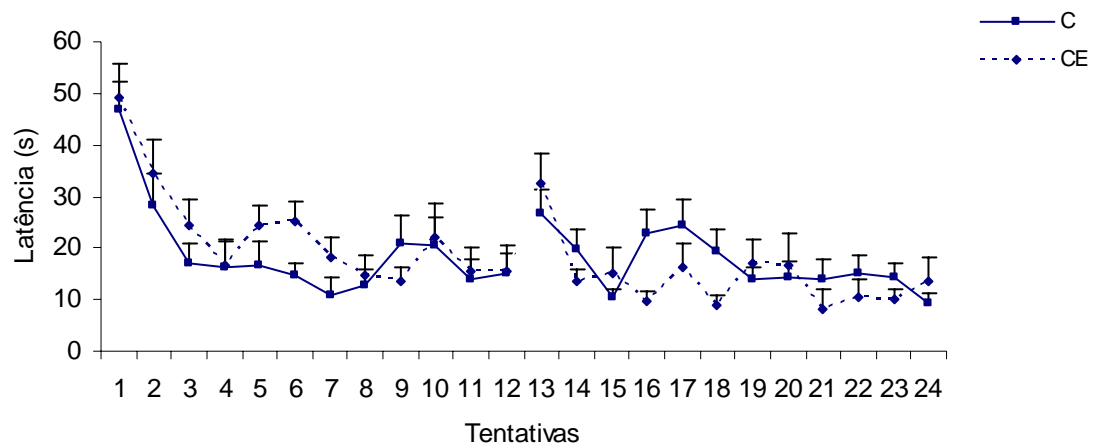


Figura 13 - Latência de fuga (Média \pm EPM) dos animais dos grupos C (n=14) e CE (n=12), nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris.

Com relação aos dados de latência dos grupos C e D, a ANOVA revelou efeito significativo do fator dieta [$F_{1,24} = 6,2$; $p < 0,05$], do fator tentativa [$F_{23,552} = 8,6$; $p < 0,05$] e de interação entre os fatores dieta x tentativa [$F_{23,552} = 2,3$; $p < 0,05$]. Esses dados mostraram uma diferença significativa de desempenho entre animais desnutridos e controles, com latências significativamente maiores dos desnutridos no primeiro dia de testes (12 primeiras tentativas), como demonstrado na Figura 14.

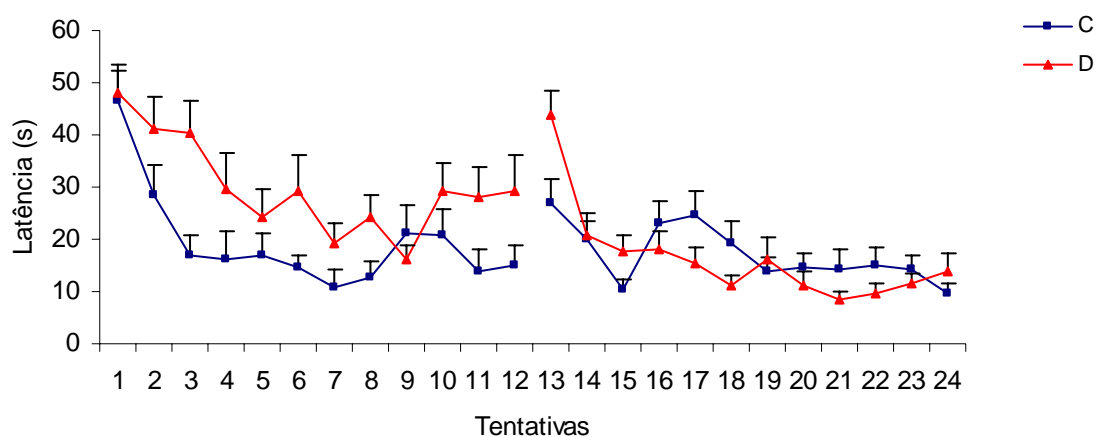


Figura 14 - Latência de fuga (Média \pm EPM) dos animais dos grupos C (n=14) e D (n=12), nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris.

A ANOVA dos grupos CE e DE revelou efeito significativo do fator dieta [$F_{1,22} = 6,5$; $p < 0,05$] e do fator tentativa [$F_{23,506} = 6,6$; $p < 0,05$]. Os dados da ANOVA mostraram que houve diferença de desempenho, na tarefa de aprendizagem, entre animais controles estressados e desnutridos estressados, com latências significativamente maiores de animais do grupo desnutrido estressado (Figura 15). Neste segundo experimento, o estresse (imposto imediatamente após o primeiro e segundo dia de testes) não alterou a diferença de desempenho entre animais desnutridos e controles.

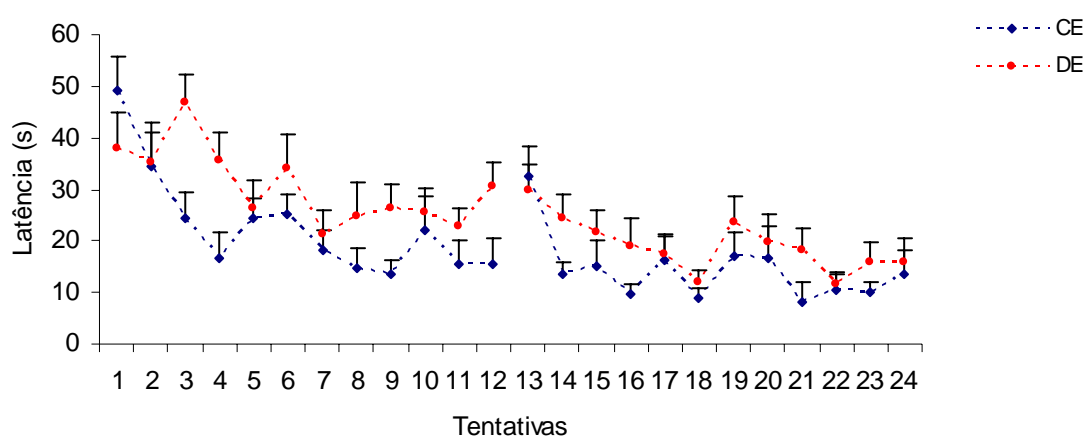


Figura 15 - Latência de fuga (Média \pm EPM) dos animais dos grupos CE (n=12) e DE (n=12), nas 24 tentativas da primeira etapa de testes, no labirinto aquático de Morris.

Com relação à tentativa *probe trial*, ao fim da primeira etapa do experimento, foi realizada uma ANOVA de três fatores (dieta x estresse x quadrante). A ANOVA revelou efeito significativo do fator quadrante [$F_{3,123} = 99,1$; $p < 0,05$] e de interação entre os fatores dieta x estresse x quadrante [$F_{3,123} = 3,5$; $p < 0,05$]. A análise de comparações múltiplas mostrou que o tempo de permanência dos quatro grupos experimentais foi significativamente maior no primeiro quadrante (quadrante alvo) – onde anteriormente encontrava-se a plataforma – em relação ao segundo, terceiro e quarto quadrantes, indicando que houve aprendizagem em todos os grupos (Figura 16).

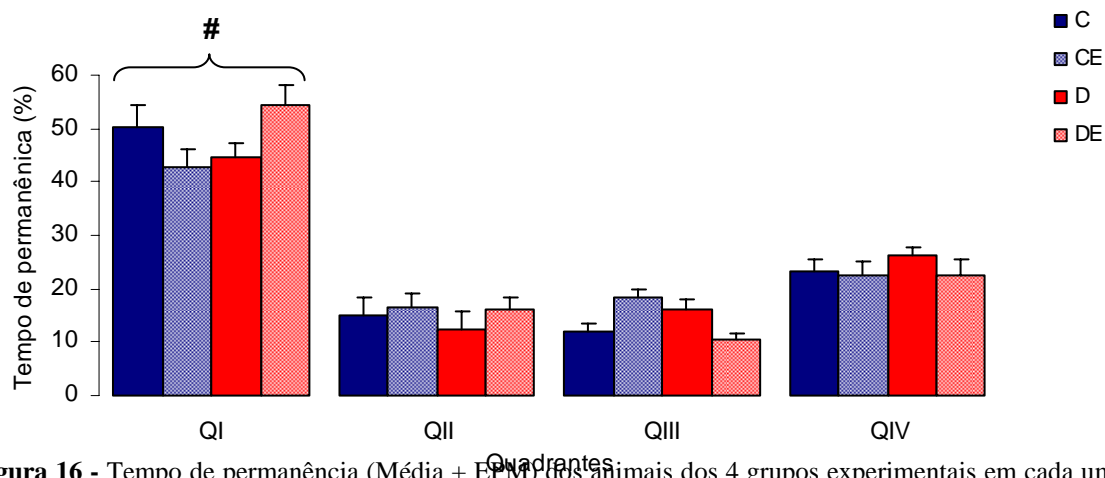


Figura 16 - Tempo de permanência (Média \pm EPM) dos animais dos 4 grupos experimentais em cada um dos 4 quadrantes imaginários do labirinto aquático de Morris, na *probe trial*. # $p < 0,05$ em relação ao tempo de permanência em QII, QIII e QIV, de acordo com o teste *Post Hoc* de Newman-Keuls.

Os dados de latência da ANOVA referentes à segunda etapa do experimento – comparação entre a latência de fuga dos animais na 24^a tentativa (última tentativa realizada no segundo dia de testes da primeira etapa) e no reteste (26^a tentativa após 28 dias) – revelou efeito significativo do fator dieta [$F_{1,46} = 8,4$; $p < 0,05$], do fator tentativa [$F_{1,46} = 23,9$; $p < 0,05$] e de interação entre os fatores dieta x tentativa [$F_{1,46} = 7,6$; $p < 0,05$]. A análise de comparações múltiplas mostrou que animais desnutridos apresentaram latências significativamente maiores na tentativa de reteste tanto em relação a animais controles nessa mesma tentativa quanto em relação a eles próprios (desnutridos) e aos controles na 24^a tentativa (Figura 17).

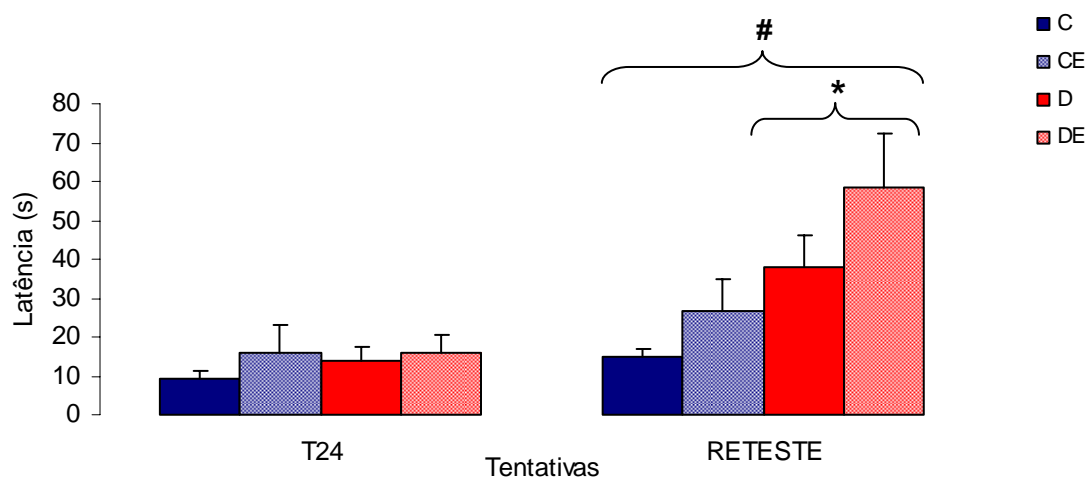


Figura 17 - Latência de fuga (Média \pm EPM) dos animais dos 4 grupos experimentais, na última tentativa da primeira etapa de testes (24^a tentativa) e após 28 dias (26^a tentativa – reteste), no labirinto aquático de Morris. * $p < 0,05$ em relação a animais controles na mesma tentativa (reteste) e em relação aos mesmos animais (desnutridos) na 24^a tentativa; # $p < 0,05$ em relação à 24^a tentativa, de acordo com o teste *Post Hoc* de *Newman-Keuls*.

5. Discussão

5.1 Tratamento nutricional

A desnutrição foi capaz de produzir efeitos expressivos sobre o desenvolvimento físico dos animais que, submetidos à dieta hipoproteica (6% de proteína), apresentaram peso significativamente menor, quando comparados a animais submetidos à dieta balanceada (16% de proteína), desde a fase de lactação até o fim do período de testes, aos 98 dias de vida.

A avaliação da perda de peso corporal das ratas-mães confirma os efeitos produzidos pelo tratamento nutricional utilizado, uma vez que esses animais estavam sob a mesma condição nutricional no início do experimento e os valores de peso corporal dos mesmos, em ambos os grupos nutricionais, eram próximos. A perda de peso corporal foi maior nas ratas-mãe do grupo desnutrido; houve diferença estatística significativa em relação ao Grupo controle durante as duas primeiras semanas de aleitamento. Essa perda de peso mais acentuada no Grupo desnutrido pode ser explicada pelo alto gasto energético causado pelos cuidados com a prole e com a produção do leite combinado à ingestão de uma dieta deficiente em proteínas, que não supre as necessidades nutricionais das ratas-mães deste grupo. Entre as ratas-mães do grupo controle a perda de peso foi mais sutil, pois apesar de terem também um alto gasto energético causado pela produção de leite e pelo cuidado com a prole, elas receberam uma dieta balanceada capaz de suprir suas necessidades nutricionais.

Os resultados encontrados estão de acordo com outros trabalhos que utilizaram dietas experimentais hipoproteicas (CAMBRAIA et al., 1997; FUKUDA et al., 2002; FUKUDA et al., 2007; HERNANDES et al., 2005; ROCINHOLI et al., 1997). Na terceira semana, a perda de peso das ratas-mães desnutridas foi significativamente menor em relação às duas primeiras semanas com um valor mais próximo ao apresentado pelas ratas-mães do Grupo controle. Esse dado pode ser atribuído à menor necessidade de cuidado com a prole que, próximo ao desmame, começa a se alimentar também com a dieta fornecida à mãe.

Os animais das ninhadas desnutridas apresentaram peso corporal significativamente menor que aqueles das ninhadas do Grupo controle desde a primeira até a última semana do período de lactação. No último dia do período de lactação (21º dia de vida), as ninhadas desnutridas apresentaram, em média, 35% do peso de ninhadas bem nutridas (Grupo controle). Este fato pode ser explicado pela redução da quantidade de proteínas ingerida pela rata-mãe na dieta hipoproteica, afetando a qualidade do leite disponível aos filhotes. Outra consequência dessa carência de proteínas é a diminuição da quantidade de leite produzido. Essa diminuição combinada à baixa qualidade do leite é capaz de influenciar de maneira direta no crescimento e desenvolvimento desses animais, como já observado em trabalhos anteriores (FUKUDA et al., 2002; DA SILVA HERNANDES, 2005; PASSOS et al., 2000; PINE et al., 1994; ROCINHOLI et al., 1997).

A diferença de peso corporal entre animais desnutridos e controles permaneceu acentuada durante todas as fases do tratamento nutricional até o fim dos testes, mesmo após o período de recuperação nutricional. Contudo, essa diferença foi maior durante os períodos de lactação e pós-lactação. Após o período de lactação a diferença de peso corporal entre desnutridos e controles aumentou e, aos 49 dias de vida (última semana do período de pós-lactação), animais desnutridos pesaram, em média, apenas 11% dos valores aferidos em animais do Grupo controle. A última semana da fase de pós-lactação representa o período mais crítico do insulto nutricional.

Essa diferença de pesos até a idade adulta pode ser explicada pelo fato de que o peso corporal dos animais adultos é determinado durante os períodos de gestação e lactação, pois depende das condições nutricionais existentes nesses períodos (PASSOS et al., 2000). Isso explica porque animais desnutridos não atingiram o peso de animais bem nutridos, corroborando resultados presentes em outros trabalhos e demonstrando que os prejuízos causados por uma desnutrição protéica severa, imposta nos estágios críticos do

desenvolvimento, podem perpetuar-se até a idade adulta (ALMEIDA et al., 1991; ALMEIDA, DE OLIVEIRA; 1994; FUKUDA et al., 2002; FUKUDA et al., 2007; DA SILVA HERNANDES et al., 2005; PASSOS et al., 2000; PINE et al., 1994). No início dos testes, aos 70 dias de vida, animais do Grupo desnutrido pesaram, em média, 40% do peso de animais do Grupo controle. Esta diferença diminuiu até o final do período de testes e, aos 98 dias de vida, animais do Grupo desnutrido pesaram, em média, 66 % do peso de animais controles. Apesar da diferença entre os pesos de animais controles e desnutridos ter se tornado menor aos 98 dias, a recuperação nutricional imposta aos 49 dias de vida, não foi suficiente para que animais desnutridos atingissem os pesos de animais controles.

Além das alterações produzidas sobre o desenvolvimento físico, no crescimento e no peso corporal, a desnutrição protéica imposta nos estágios iniciais de desenvolvimento, pode também provocar alterações a médio e longo prazo no SNC em termos estruturais, neuroquímicos, neurofisiológicos e comportamentais, capazes de causar atrasos no desenvolvimento cognitivo, tais como déficits de memória e problemas de aprendizagem (ALMEIDA et al., 1991; ALMEIDA, DE OLIVEIRA, 1994; ALMEIDA et al., 1996; BEDI, 1991; MORGANE et al., 1993; MORGANE et al., 2002; TONKISS et al., 1994).

Uma estrutura do SNC afetada pela desnutrição protéica precoce particularmente relacionada aos processos de aprendizagem e memória é o hipocampo. Estudos anteriores demonstraram que a desnutrição protéica pode comprometer a formação dessa estrutura prejudicando a capacidade de memória e ocasionando problemas de aprendizagem (LUKOYANOV, ANDRADE, 2000; MORGANE et al., 1993; MORGANE et al., 2002).

Os resultados encontrados sugerem que a desnutrição protéica imposta durante as fases de lactação e pós-lactação pode ter produzido efeitos deletérios sobre o desenvolvimento do SNC e, mais especificamente, sobre a formação hipocampal, pois foram observados déficits de aprendizagem e memória espacial em animais desnutridos, evidenciados por prejuízos na

capacidade de recuperação e reutilização das informações processadas durante a primeira etapa de testes, na tarefa do labirinto aquático de Morris. Como demonstrado em outros trabalhos que investigaram os efeitos da desnutrição protéica precoce em modelos de experimentação animal, alterações comportamentais e déficits de aprendizagem e memória estão diretamente relacionados a alterações em diversos sistemas de neurotransmissão (ALMEIDA et al., 1996) e a modificações funcionais e morfológicas de algumas estruturas cerebrais envolvidas nos processos de aprendizagem e memória (MORGANE et al., 1993; MORGANE et al., 2002; FUKUDA et al., 2007; LUKOYANOV, ANDRADE, 2000).

No presente estudo, os animais foram submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris e precisaram estabelecer relações entre as pistas externas do labirinto e a posição da plataforma submersa, para realizarem a tarefa de aprendizagem e memória espacial e conseguirem escapar do estímulo aversivo (água). Trabalhos anteriores demonstraram que a desnutrição protéica precoce prejudica o aprendizado da tarefa no labirinto aquático, pois animais desnutridos, apesar de aprenderem a tarefa, apresentaram latências significativamente maiores que animais controles tanto durante as tentativas realizadas nas sessões de treino quanto na tentativa de reteste, realizada num momento posterior para análise da capacidade de recuperação e reutilização das informações processadas e aprendidas na primeira etapa (FUKUDA et al., 2002; FUKUDA et al., 2007).

Os dados apresentados no presente trabalho estão de acordo com os resultados apresentados em trabalhos anteriores, por demonstrarem que animais desnutridos nos estágios iniciais de desenvolvimento apresentaram déficits de aprendizagem e memória espacial, desenvolveram a tarefa com latências significativamente maiores que animais controles (bem nutridos) e demonstraram prejuízos na recuperação e reutilização das informações processadas na fase de treino (tentativas realizadas na primeira etapa de testes).

Além da diferença de desempenho, evidenciada na primeira etapa de testes, animais desnutridos apresentaram tempo de permanência significativamente menor que controles no quadrante alvo da *probe trial*. A *probe trial*, realizada imediatamente após a última tentativa do segundo dia de testes, foi utilizada para analisar a precisão de navegação dos animais em busca da plataforma de fuga. Apesar de animais do Grupo D terem apresentado tempo de permanência significativamente menor, em comparação aos outros grupos, no quadrante alvo, é possível afirmar que houve aprendizagem em todos os grupos experimentais, pois todos diminuíram as latências ao longo das tentativas do primeiro e segundo dias de teste, e apresentaram um maior percentual de tempo de navegação no quadrante alvo (QI), em relação aos outros quadrantes do labirinto.

5.2 Efeitos da interação entre estresse agudo e desnutrição

Modificações funcionais e morfológicas de estruturas do SNC envolvidas no aprendizado e na memória, provocadas por desnutrição protéica ou protéico-calórica precoce, podem alterar os padrões comportamentais de respostas, em relação a quaisquer variáveis que atuem sobre essas mesmas estruturas, como a responsividade a drogas que agem no SNC (ALMEIDA et al., 1996) ou mesmo as reações comportamentais ao estresse (FRANÇOLIN-SILVA, ALMEIDA, 2004).

No presente estudo, verificou-se que animais desnutridos apresentaram um desempenho claramente melhorado após exposição a um breve episódio de estresse antes da realização de uma tarefa de aprendizagem e memória, pois comparados a animais desnutridos não estressados mostraram latências significativamente menores na primeira etapa de testes. E quando comparados ao desempenho de animais controles estressados não apresentaram diferença significativa. Animais controles estressados não apresentaram quaisquer alterações de desempenho em relação a animais controles não estressados. Esses dados sugerem que o

procedimento de estresse agudo não foi capaz de produzir alterações comportamentais relevantes em ratos controles. Contudo, animais desnutridos parecem ter sido mais reativos ao procedimento de estresse utilizado, que pode ser aversivo e animais desnutridos são mais reativos a estímulos de natureza aversiva/dolorosa (ROCINHOLI et al., 1997).

Existem evidências de que memórias relacionadas a eventos traumáticos seriam formadas e consolidadas de maneira mais efetiva de acordo com a proporção de sua importância para a sobrevivência e que sua evocação seria facilitada em situações semelhantes, como em estados de alerta, ansiedade ou estresse (JEANSOK, DIAMOND, 2002; JOCA et al., 2003; MARGIS et al., 2003; MCEWEN, 2000; QUEVEDO et al., 2003). No Experimento I, animais desnutridos estressados, na tentativa de reteste (28 dias após a primeira etapa), apresentaram latências significativamente maiores em relação à latência apresentada na última tentativa da primeira etapa e não houve diferença em relação à latência de animais desnutridos não estressados na tentativa de reteste. Esses resultados mostram que, apesar de o procedimento de estresse agudo ter melhorado o desempenho dos animais desnutridos na fase de treino (nas tentativas realizadas na primeira etapa), este procedimento não foi capaz de produzir efeitos permanentes sobre a memória de longo prazo (memória de referência), e a capacidade de recuperação e reutilização das informações processadas na etapa inicial parece ter sido prejudicada em animais desnutridos estressados.

Diversos estudos têm demonstrado que as respostas do organismo ao estresse são moduladas por alterações neuroquímicas, fisiológicas e comportamentais, e envolvem mecanismos adaptativos que permitem que o organismo reaja de maneira eficaz a ameaças reais ou potenciais à sobrevivência (JEANSOK, DIAMOND, 2002; MCEWEN, SAPOLSKY, 1995; MCEWEN, 2000).

Variáveis como o contexto em que as informações são processadas, ou mesmo o estado glicêmico do organismo, interferem na modulação das informações pelo SNC, e de forma

mais direta, pelo hipocampo, determinando a precisão com que ocorrerá a retenção e consolidação da memória (MCEWEN, SAPOLSKY, 1995). O estado emocional é considerado um importante filtro desse processo adaptativo de resposta a situações aversivas ou de estresse intenso e a resposta orgânica ao estresse é determinada pela maneira com que o indivíduo percebe e reage aos estímulos do ambiente. Animais desnutridos apresentam padrões comportamentais alterados, devido aos efeitos do insulto nutricional imposto nas fases iniciais de desenvolvimento, sugerindo que esses animais respondam de forma diferenciada ao estresse.

Muitos trabalhos anteriores demonstraram que a desnutrição protéica ou protéico-calórica, quando imposta nos períodos pré e/ou pós-natal, é capaz de produzir modificações em vários sistemas de neurotransmissão, tais como os sistemas gabaérgico, catecolaminérgico, serotoninérgico, opióide, colinérgico, e que essas modificações resultam em uma responsividade alterada tanto em relação às drogas que agem no SNC, quanto a outras variáveis que dependam do funcionamento normal desses sistemas de neurotransmissão. Desse modo, além de alterações estruturais no SNC, as bases neuroquímicas responsáveis pelos processos adaptativos de resposta ao estresse também estavam alteradas em animais desnutridos, justificando os efeitos desiguais entre esses animais e animais controles, quando ambos foram submetidos à imobilização imposta antes da tarefa de aprendizagem e memória.

No Experimento I, o estresse agudo não afetou o desempenho dos animais na *probe trial*, pois tanto animais desnutridos quanto controles, estressados e não estressados, apresentaram maior percentual de tempo de navegação, em busca da plataforma, no quadrante alvo, demonstrando que houve aprendizagem espacial nos quatro grupos, neste primeiro experimento.

Na tentativa de reteste, todos os grupos apresentaram aumento nas latências, em relação à última tentativa da primeira etapa, mas houve aumento significativo apenas em animais do

Grupo DE. Esse dado demonstra que apesar de animais desnutridos estressados terem seu desempenho melhorado na primeira etapa de testes, decorridos 28 dias, esse efeito do estresse sobre o desempenho dos animais desnutridos parece desaparecer e as latências desses animais na tentativa de reteste apresentam valores mais próximos daqueles registrados no grupo desnutrido não estressado. Este fato sugere que o estresse pode ter facilitado o aprendizado de animais desnutridos na tarefa de aprendizagem do experimento I, melhorando o processamento das informações espaciais, mas depois de 28 dias não houve diferença entre o desempenho desses animais e o desempenho de animais não estressados. Esses resultados sugerem que o estresse associado à desnutrição protéica precoce parece facilitar a aprendizagem em tarefas aversivas, uma vez que animais desnutridos são mais reativos a este tipo de estímulo. Entretanto, parece haver prejuízos na consolidação da memória tanto em animais desnutridos estressados quanto em animais desnutridos não estressados. A consolidação da memória em áreas corticais é tarefa exercida pelo hipocampo, estrutura do SNC que apresenta desenvolvimento tardio (período pós-natal) e que pode ter sido afetada pela desnutrição protéica imposta no mesmo período.

Essa melhora no desempenho de animais desnutridos submetidos ao estresse antes da tarefa, apenas na primeira etapa de testes (período de processamento das informações espaciais e aquisição da memória), pode estar relacionada ao fato de que o insulto nutricional severo, imposto no início da vida, foi capaz de produzir alterações permanentes no SNC, enquanto que o episódio de estresse agudo foi capaz de provocar apenas alterações breves e circunstanciais.

Em suma, o procedimento de estresse agudo afetou o desempenho de animais desnutridos durante a fase de treino da tarefa de aprendizagem e memória. Porém, não houve alterações significativas permanentes decorrentes dos efeitos do estresse agudo, como demonstrado na tentativa de reteste, na qual animais desnutridos estressados e não estressados demonstraram

prejuízos nos processos de evocação e reutilização das informações processadas na primeira etapa. De acordo com os resultados encontrados, animais desnutridos foram mais fortemente influenciados pelo estresse agudo imposto antes da tarefa do labirinto aquático.

No Experimento II, os animais foram submetidos ao estresse imediatamente após a última tentativa do primeiro dia de testes e, novamente, após a última tentativa do segundo dia de testes, 12^a e 24^a tentativas, respectivamente. Neste segundo experimento, não houve diferença significativa de desempenho entre animais estressados e não estressados de um mesmo grupo nutricional. Animais desnutridos estressados e não estressados apresentaram latências maiores, quando comparados a animais controles, em todas as etapas de teste.

Na *probe trial*, todos os grupos apresentaram maior percentual de tempo de navegação no quadrante alvo (QI), comparado ao tempo despendido nos demais quadrantes imaginários (QII, QIII e QIV), e não houve diferença significativa entre os grupos C, CE, D e DE, quanto ao percentual de tempo despendido em QI. Esses resultados demonstram que todos os grupos, independentemente do tratamento nutricional e do estresse, aprenderam com precisão a tarefa do labirinto aquático, no Experimento II.

O intervalo de 24 horas entre a aquisição e a reutilização da informação é um período de tempo relativamente curto para o esquecimento da tarefa, visto que as latências das primeiras tentativas do segundo dia de testes aumentaram pouco, em relação às latências das últimas tentativas do dia anterior, igualando-se a elas gradativamente. O estresse foi imposto nestes momentos (intervalos de retenção – 24 horas) para avaliação dos possíveis efeitos sobre os processos de retenção e consolidação da memória. Contudo, o estresse agudo não foi capaz de comprometer o aprendizado e, tampouco, a recuperação e reutilização das informações aprendidas na primeira etapa de testes.

Os resultados encontrados no Experimento II indicam que o estresse agudo imposto imediatamente após a última tentativa de cada um dos dois dias de testes, na fase de treino,

não representou um evento suficientemente significativo para produzir efeitos sobre os processos de aquisição, consolidação e evocação da memória (operacional e de referência) espacial e, conseqüentemente, sobre a aprendizagem espacial.

O presente trabalho teve como objetivo a investigação dos efeitos do estresse agudo, imposto em dois momentos distintos, associado à desnutrição protéica precoce sobre a aprendizagem e a memória de ratos no MWM, constituindo-se um estudo comportamental. Verificou-se que a interação entre estresse agudo e desnutrição protéica precoce pode produzir efeitos bastante variados sobre os processos de aprendizagem e memória espacial. O momento em que o estresse é imposto – antes, durante ou depois de uma tarefa de aprendizagem – determina os efeitos que esse evento terá sobre o processamento das informações aprendidas num dado contexto ambiental.

Variações nos procedimentos experimentais utilizados, tais como tipo de estresse utilizado, momento em que o estresse foi imposto, idade dos sujeitos no momento em que o estresse foi imposto, idade dos sujeitos no período de testes, tipo de teste utilizado (como, por exemplo, aprendizagem e memória, comportamento exploratório, testes de ansiedade), entre outros, produzem efeitos bastante distintos sobre o comportamento e a cognição.

Desse modo, são necessárias pesquisas sobre o envolvimento do hipocampo e de outras estruturas do SNC envolvidas nos processos de aprendizagem e memória e na modulação de respostas adaptativas do organismo frente a eventos aversivos ou ameaçadores, para que se possa compreender com maior clareza o papel das variáveis determinantes na regulação desses processos.

6. Conclusões

A desnutrição protéica precoce prejudicou o desenvolvimento físico, ocasionando déficits de crescimento e redução do peso corporal. Animais desnutridos apresentaram pesos corporais significativamente mais baixos que animais controles desde a primeira semana do período de lactação até o final dos testes, aos 98 dias de vida. A desnutrição protéica também produziu déficits de aprendizagem e memória espacial nos animais submetidos aos dois experimentos, tanto na primeira etapa de testes quanto na tentativa de reteste. A imobilização, como agente estressor, imposta antes da tarefa de aprendizagem espacial no MWM, melhorou o desempenho de animais desnutridos. Animais controles não foram afetados por esse procedimento de estresse agudo. A imobilização imposta após a última tentativa do primeiro e segundo dia de testes não alterou o desempenho dos animais, tanto controles quanto desnutridos, na tarefa de aprendizagem e memória espacial, no MWM. A *probe trial*, em ambos os experimentos, indicou que os animais de todos os grupos navegaram com precisão em busca do local onde, anteriormente, estava fixada a plataforma de fuga. Esses resultados demonstraram que houve aprendizagem espacial em todos os grupos. A tentativa de reteste demonstrou que animais desnutridos, estressados e não estressados, apresentaram déficits de memória, pois mostraram dificuldades em recuperar e reutilizar as informações espaciais aprendidas na primeira etapa de testes.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. S.; DE OLIVEIRA, L. M.; GRAEFF, F. G. Early protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity of anxiolytics. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 513-518, 1991.
- ALMEIDA, S. S.; DE-OLIVEIRA, L. M. Acquisition and extinction of jumping, two-way shuttle-box and bar press avoidance responses in malnourished rats: effects of shock intensity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 10, p. 2443-2452, 1994.
- ALMEIDA, S. S.; TONKISS, J.; GALLER, J. R.; Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 20, p. 389 – 402, 1996.
- ALMEIDA, S. S.; DE ARAÚJO, M. Postnatal protein malnutrition affects play behavior and other social interactions in juvenile rats. **Physiology and Behavior**, v. 74(1-2), p. 45-51, 2001.
- ARRUDA, I. K. G.; ARRUDA, B. K. G. Nutrição e desenvolvimento. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 3, p. 392-397, 1994.
- 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.
- BARROS, F. Pobreza, desnutrição e mortalidade infantil: condicionantes sócio-econômicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 9, n. 1, p. 114-115, 1993.
- BEDI, K. S. Lasting neuroanatomical changes following undernutrition during early life. In: DOBBING, J. (Ed) **Early malnutrition and later achievement**. Academic Press, London, p. 2-49, 1987.
- BEDI, K. S. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 311, p. 425-433, 1991.
- BEDI, K. S. Spatial Learning Ability of Rats Undernourished During Early Postnatal Life. **Physiology & Behavior**, v. 51, p. 1001-1007, 1992.

CABALLERO, B. Global patterns of child health: the role of nutrition. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 46 (1), p. 3-7, 2002.

CARVALHAES, M. A. B. L.; BENÍCIO, M. H. DA. Capacidade Materna de Cuidar e Desnutrição Infantil. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, p. 188-197, 2002.

CASTRO, C. A.; TRACY, M.; RUDY, J. W. Early life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory process mediating performance in a conditional-spatial discrimination task. **Behavioural Brain Research**, v. 32, p. 255-264, 1989.

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**, vol. 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, p. 883-890, 1989.

CINTRA, L.; DÍAZ-CINTRA, S.; GALVAN, A.; KEMPER, T.; MORGANE, P. J. Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. **Brain Research**, v. 532, p. 271-277, 1990.

CRNIC, L. S.; CHASE, H. P. Models of infantile malnutrition in rats: effects on milk. **Journal of Nutrition**, v. 108, p. 1755-1760, 1978.

DA SILVA HERNANDES, A. S.; FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; VALADARES, C. T.; FUKUDA, M. T. H.; ALMEIDA, S. S. Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 162, p. 240-245, 2005.

DATTA, S. et al. Prenatal protein malnourished rats show changes in sleep/wake behavior as adults. **Journal of Sleep Research**, v. 9, n. 1, p. 71-79, 2000.

DE OLIVEIRA, A. C. et al. Acute stressor-selective effect on total plasma homocysteine concentration in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 2, p. 269-273, 2004.

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.

DRONJAK, S. et al. Immobilization and cold stress affect sympatho–adrenomedullary system and pituitary–adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 3, p. 409-415, 2004.

DURÁN, P.; GALLER, J. R.; CINTRA, L.; TONKISS, J. Prenatal malnutrition and sleep states in adult rats: Effects of restraint stress. **Physiology & Behavior**, v. 89, n. 2, p. 156-163, 2006.

ELIZABETH, K. E.; SATHY, N. The role of developmental stimulation in nutritional rehabilitation. **Indian Pediatrics**, v. 34, n. 8, p. 681-695, 1997.

FALBO, A. R.; ALVES, J. G. B. Desnutrição grave: alguns aspectos clínicos e epidemiológicos de crianças hospitalizadas no Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP), Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1473-1477, 2002.

FERREIRA, M M. **Pesquisa Nacional Por Amostra de Domicílios – Segurança Alimentar, 2004.**

Disponível

em:

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2004/>>.

Acesso em: 12 ago. 2006.

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, n. 7, p. 1035-1042, 2004.

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

FUKUDA, M.T.; FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; HERNANDES, A. S.; VALADARES, C. T.; ALMEIDA, S. S. Effects of early protein malnutrition and scopolamine on learning and memory in the Morris water maze. **Nutritional Neuroscience**, v. 10(5-6), p. 251 – 259, 2007.

GALLER, J. R.; TONKISS, J.; MALDONADO-IRIZARRY, C. S. Prenatal protein malnutrition and home orientation in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 55, n. 6, p. 993-996, 1994.

GALLER, J. R.; SHUMSKY, J. S.; MORGANE, P. J. Malnutrition and brain development. In: Walker, W. A. and Watkins, J. (Eds.) **Nutrition in Pediatrics**. 2nd edition. France: Plenum Press, p. 194-210, 1995.

GEORGIEFF, M. K.; Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 614-620, 2007.

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

IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: **Artmed**, 1^a edição, 96 p., 2002.

JAISWAL, A. K.; UPADHYAY, S. N.; SATYAN, K. S.; BHATTACHARYA, S. K. Comparative effects of prenatal and postnatal undernutrition on learning and memory. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, p. 17-22, 1999.

JEANSOK, J. K.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, p. 453-462, 2002.

JOCA, S. R.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, Depressão e Hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25(2), p. 46-51, 2003.

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

LUKOYANOV, N. V.; ANDRADE, J. P. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. **Behavioural Brain Research**, v. 112, p. 85-97, 2000.

MAISONNETTE, S.; MORATO, S.; BRANDÃO, M. L. Role of resocialization and of 5-HT_{1A} receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 4, p. 753-758, 1993.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A. F. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria**, v. 25(1), p. 65-74, 2003.

MASSARO, T. F.; LEVITSKY, D. A.; BARNES, R. H. Protein malnutrition in the rat: its effects on maternal behavior and pup development. **Developmental Psychobiology**, v. 7, p. 551-561, 1974.

MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5(2), p. 205-216, 1995.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, p. 172-189, 2000.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R. J.; BRONZINO, J. D.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J. R. Prenatal Malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91-128, 1993.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 471-483, 2002.

MORRIS, R. G. M. Spatial Localization Does Not Require the Presence of Local Cues. **Learning and Motivation**, v. 12, p. 239-260, 1981.

MOYSÉS, M. A. A.; LIMA, G. Z. Desnutrição e fracasso escolar: uma relação tão simples? **Revista Ande**, v. 1, n. 5, p. 57-61, 1982.

NORD, M.; ANDREWS, M.; CARLSON, S. **Household food security in the United States, 2004**. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/Publications/err11/>>. Acesso em: 12 ago. 2006.

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

OLTON, D. S. Mazes, maps and memory. **American Psychology**, v. 34, p. 583-596, 1979.

PADOVAN, C. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restrain stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 2, p. 325-330, 2000.

PASSOS, M. C. F.; RAMOS, C. F.; MOURA, E. G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, v. 11(20), p. 1603-1612, 2000.

PATIN, V.; LORDI, B.; VINCENT, A.; CASTON, J. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. **Brain Research. Developmental Brain Research**, v. 160(2), p. 265-274, 2005.

PAWELLEK, I.; DOKOUPIL, K.; KOLEZTKO, B.; Prevalence of malnutrition in paediatric hospital patients. **Clinical Nutrition**, v. 27, p. 72-76, 2008.

PINE, A. P.; JESSOP, N. S.; OLDHAM, J. D. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats: The effect of dietary protein restriction and stage of lactation on milk composition. **Brazilian Journal Nutrition**, v. 72, p. 815-830, 1994.

QUEVEDO J.; FEIER, G.; AGOSTINHO, F. R.; MARTINS M. R.; ROESLER, R. Consolidação da memória e estresse pós-traumático. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 1, p. 25-30, 2003.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. J. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report for the American Institute of AIN-76 rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RIUL, T. R.; CARVALHO, A. F.; ALMEIDA, P. S.; DE OLIVEIRA, L. M.; ALMEIDA, S. S. 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. 975-983, 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.

ROSA, M. L.; GUIMARÃES, F. S.; DE OLIVEIRA, R. M.; PADOVAN, C. M.; PEARSON, R. C.; DEL BEL, E. A. Restrain stress induces beta-amyloid precursor protein mRNA expression in the rat basolateral amygdala. **Brain Research Bulletin**, v. 65, n.1, p. 69-75, 2005.

SANTOS, A. M. G. Aprendizagem e memória no Labirinto Aquático de Morris. In: XAVIER, G. F. (org.) Técnicas para o estudo do sistema nervoso. São Paulo: **Plêiade**, p. 131-154, 1999.

SANTUCCI, L. B.; DAUD, M. M.; ALMEIDA, S. S.; DE OLIVEIRA, L. M. 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, n. 2, p. 393-398, 1994.

SMART, J. L.; PREECE, J. Maternal behavior of undernourished mother rats. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 613-619, 1973.

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

TONKISS, J.; FOSTER, G. A.; GALLER, J. R. Prenatal protein malnutrition and hippocampal function: partial reinforcement extinction effect. **Brain research bulletin**, v. 27, n. 6, p. 809-813, 1991.

TONKISS, J.; SHULTZ, P.; GALLER, J.R. An analysis of spatial navigation in prenatally protein malnourished rats. **Physiology & Behavior**, v. 55, n. 2, p. 217-224, 1994.

VICTORA, C. G.; ADAIR, L.; FALL, C.; HALLAL, P. C.; MARTORELL, R.; RICHTER, L.; SACHDEV, H. S. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. **Lancet**, v. 371, p. 340-357, 2008.

WOLF, C.; ALMLI, C. R.; FINGER, S.; RYAN, S.; MORGANE, P. J. Behavioral effects of severe and moderate early malnutrition. **Physiology & Behavior**, v. 38, n. 5, p. 725-730, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental health: facing the challenges, building solutions**. Report from the WHO European Ministerial Conference, 2005. Dinamarca. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/InformationSources/Publications/>> Acesso em: Abril de 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental health**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/mental_health/> Acesso em: Abril de 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Nutrition health topics**. Disponível em: <<http://www.who.int/nutrition/topics/>> Acesso em: Abril de 2008.

YAMAMOTO, R. M.; LOPES, F. M.; PINTO, M. M. S.; ITO, R. K. L.; IVERSEN, R.; CUNHA, S. Retardo de crescimento secundário à desnutrição no segundo ano de vida: há recuperação até a idade escolar? **Pediatria**, n. 1, p. 37-44, 2001.

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](#)