

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

PRISCILA REBOLLO DE CAMPOS

**Efeitos da desnutrição protéica precoce e da estimulação ambiental no
comportamento exploratório e em parâmetros bioquímicos de poliaminas
cerebrais e corticosterona plasmática em ratos**

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

PRISCILA REBOLLO DE CAMPOS

Efeitos da desnutrição protéica precoce e da estimulação ambiental no comportamento exploratório e em parâmetros bioquímicos de poliaminas cerebrais e corticosterona plasmática em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida

Ribeirão Preto
2008

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

DeCampos, Priscila R.

Efeitos da desnutrição protéica precoce e da estimulação ambiental no comportamento exploratório e em parâmetros bioquímicos de poliaminas cerebrais e corticosterona plasmática em ratos. Ribeirão Preto, 2008.

66 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. Estimulação tátil.
3. Exploração e ansiedade.
4. corticosterona e poliaminas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscila Rebollo de Campos

“Efeitos da desnutrição protéica precoce e da estimulação ambiental no comportamento exploratório e em parâmetros bioquímicos de poliaminas cerebrais e corticosterona plasmática em ratos”

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a 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: _____

*Aos meus pais, Heitor e Maria Helena, e aos meus irmãos, Heitor Neto, Débora e Rebeca;
pelo amor, carinho, apoio e incentivo imensuráveis. Vocês têm meu amor e gratidão eternos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Marcellino de Oliveira (*in memoriam*), pela oportunidade, confiança e orientação desde a iniciação científica até o mestrado. Sou muito grata pelos ensinamentos ao longo desses quase 6 anos.

Ao Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida, pela pronta acolhida, incentivo, confiança, disciplina imposta, pela orientação e finalização deste trabalho. Muito obrigada: a você, minha eterna admiração.

Ao técnico Dalmo César Presta Nicola, pela presteza, dedicação e carinho irrepreensíveis. Fundamental, sempre. Insubstituível.

Às minhas amigas Bruna (Brux), Giovana, Carlinha e Sarah. Dividimos mais do que um teto (a Terra do Nunca); compartilhamos alegrias, frustrações, sorrisos, tristezas, expectativas... Compartilhamos uma vida! Amo vocês!

Aos meus amigos, conselheiros e portos-seguro Gustavo e Anselmo. Pela presença (perto ou distante), pelo carinho, pelos conselhos, pela amizade... Por eu poder ter a certeza de que vocês estão sempre ali. Amo vocês!

À minha grande amiga Glaucia, pela amizade, cumplicidade, carinho e atenção infinitos. Por eu ter a certeza de que você também está sempre ali, ou aqui, ou lá.

Aos meus amigos desde a época da graduação Milene (Mi), Priscila (Xaxi), Adriano (Filhote), Chico e Guilherme (Bazé), prova viva de que a amizade verdadeira vai além da sala de aula.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição, Desenvolvimento e Comportamento Daniela (não só de laboratório, por me ouvir e ser tão presente), Édson, Roberto e Aninha, pela amizade, auxílio, apoio e cafés... E recentemente Gisele, Natália, Idalina, Mariana, Fernanda, Marisa, Lucas, Camila e Paula que recentemente me acolheram. Obrigada por tudo.

Dentre os colegas de laboratório, um agradecimento especial ao Valdomiro, pela orientação, ensinamentos, auxílios constantes, interpretação de dados, análises estatísticas e revisões. Meu eterno agradecimento e carinho, consciente de que você foi o alicerce desse trabalho.

Aos Profs. Drs. José Antunes Rodrigues, Júlio Sérgio Marchini, Marcus Lira Brandão e Lucila Leico Kagohara Elias, pela disponibilidade dos respectivos laboratórios e equipamentos. Aos técnicos Gilberto João Padovan e Maria Valci Silva pela solicitude e análises bioquímicas.

Ao José Luiz Liberato (agora Mestre!) pela amizade e pelos auxílios no uso de programas de computador (nesta ordem).

À minha família, por todo apoio e dedicação, que nunca me deixaram desistir, e sempre acreditaram em mim. Fonte de inspiração e segurança!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo no. 06/53857-2), e Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior – CAPES - pelo financiamento deste trabalho.

E finalmente, porém não menos importante, a Deus, por ter colocado todas essas pessoas maravilhosas na minha vida!

RESUMO

DECAMPOS, P. R. **Efeitos da desnutrição protéica precoce e da estimulação ambiental no comportamento exploratório e em parâmetros bioquímicos de poliaminas cerebrais e corticosterona plasmática em ratos.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A desnutrição causa prejuízos para a capacidade funcional do organismo resultando em alterações estruturais, neuroquímicas e comportamentais durante o desenvolvimento cerebral. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da desnutrição protéica e da estimulação precoces sobre o comportamento exploratório de ratos nas tábuas de buracos de 4 e 5 furos. Animais de vários grupos, testados ou não na tábua de buracos, tiveram os níveis de poliaminas no estriado e no hipocampo determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, e de corticosterona plasmática por radioimunoensaio. A secreção de glicocorticóides pelo córtex da glândula adrenal pode ser alterada em função do estresse nutricional. Ratos expostos a altos níveis de glicocorticóides durante a primeira semana de vida mostram comportamento social alterado e prejuízos em modelos de aprendizagem, então ratos desnutridos (dieta 6% de proteína) e controles (dieta 16% de proteína) foram submetidos a estimulação tátil e testados ou não na tábua de buracos antes de serem sacrificados para a quantificação dos níveis de poliaminas e corticosterona. Os resultados mostraram que a desnutrição diminui, enquanto que a estimulação aumenta a exploração na tábua de buracos. A corticosterona não foi alterada pelo estado nutricional, mas diminuiu com a estimulação e aumentou com o teste. Foi observada uma menor taxa de espermidina/espermina no estriado dos animais testados. Estes dados sugerem que prejuízos no comportamento exploratório de animais podem ser revertidos pela estimulação tátil, entretanto a desnutrição precoce não altera os níveis de corticosterona plasmática ou de poliaminas cerebrais.

Palavras-chave: Desnutrição protéica precoce, estimulação tátil, comportamento exploratório, corticosterona e poliaminas

ABSTRACT

DECAMPOS, P. R. **Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation on the exploratory behavior and the cerebral polyamines and plasmatic corticosterone parameters in rats.** Master Thesis - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Malnutrition results in impairments to the functional ability in animals, resulting in structural, neurochemical and behavioral changes during brain development. This main objective of the present study was to investigate the effects of early protein malnutrition and early tactile stimulation on the exploratory behavior of rats submitted to a 4 or 5-holes hole board test. Animals of the various groups, tested or non-tested in the hole board, were also used to determine the polyamines levels in the striatum and hippocampus using high performance liquid chromatography, as well as the corticosterone plasmatic levels by the radioimmunoassay method. As the secretion of glucocorticoids by adrenal gland cortex may be altered by nutritional stress and high levels of glucocorticoids during first week of life has been shown to alter the behavior of rats in social and learning models, then malnourished (6% protein diet) and well-nourished (16% protein diet) animals were submitted to tactile stimulation and tested or non-tested in the hole board before sacrifice for polyamines and corticosterone determination. The results showed that malnutrition decrease while tactile stimulation increase exploration in the hole board. Plasmatic corticosterone was not altered by nutritional status but was decreased by both tactile stimulation and increased by test in the hole board. It was also found a significant decrease on the spermidine/spermine rates in the striatum of animal tested in the hole board. These data suggest impairments of exploratory behaviors in malnourished animals can be reversed by tactile stimulation, however early malnutrition can not change plasmatic corticosterone and brain polyamines levels.

Key-words: Early protein malnutrition, tactile stimulation, exploratory behavior, corticosterone and polyamines.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODO	19
2.1. Procedimentos Gerais	19
2.2. Medidas comportamentais	22
2.3. Medidas bioquímicas	23
3. ANÁLISE DOS DADOS	26
4. RESULTADOS	28
4.1. Peso Corporal	28
Rata-mãe	28
Filhotes	29
4.2. Dados comportamentais	33
Tábua de Buracos com 4 Furos	33
Tábua de Buracos de 5 Furos	37
4.3. Dados bioquímicos	43
Corticosterona plasmática	43
Poliaminas	45
5. DISCUSSÃO	48
5.1. Peso corporal	48
5.2. Dados comportamentais	48
5.3. Dados bioquímicos	51
Corticosterona plasmática	51
Poliaminas cerebrais	54
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A má nutrição é um problema de ordem global que afeta milhões de crianças durante o período mais vulnerável do desenvolvimento cerebral. O termo “má nutrição” implica que um ou mais nutrientes estão ausentes na dieta ou são oferecidos em uma proporção inadequada (Morgane *et al.*, 2002).

Segundo as estimativas da FAO (Food Agriculture Organization), no período de 1997 a 1999 havia no mundo cerca de 815 milhões de pessoas expostas à desnutrição crônica, sendo que 95,3% das pessoas desnutridas viviam em países em desenvolvimento e apenas 1,3% em países industrializados. Os pesquisadores da década de 90 faziam previsões de que levaria cerca de 15 anos para que se reduzissem os índices de desnutrição, mas atualmente a FAO prevê que, caso não sejam adotadas políticas mais adequadas de combate à fome e à desnutrição, serão necessários 60 anos para reduzir o número de pessoas desnutridas (FAO, 2001), o que salienta o quão insuficientes têm sido as medidas adotadas por diversos países no combate à fome.

O resultado da ineficiência de tais políticas de combate à fome é que cerca de 30% da população mundial continua exposta a alguma forma de má nutrição, gerada por uma distribuição desigual de alimentos em que as necessidades nutricionais das pessoas não são satisfatoriamente atendidas (FAO, 2005).

Para estudo dos efeitos da desnutrição, têm sido utilizados modelos animais com os quais é possível analisar experimentalmente níveis mais intensos de falta de nutrientes e também permitem maior controle de variáveis com procedimentos e medidas refinadas, possibilitando a identificação do período de início e de término da desnutrição, bem como os efeitos diferenciais dos vários graus de desnutrição (Morgane *et al.*, 1992, 1993).

Embora a seqüência básica dos processos de desenvolvimento cerebral não varie fundamentalmente entre os mamíferos, as diferenças espécies-específicas no desenvolvimento

do cérebro devem ser levadas em conta ao analisar os efeitos da desnutrição sobre o cérebro e as conseqüências para o comportamento (Morgane *et al.*, 2002). Os modelos animais permitem comparar o efeito da má nutrição em diferentes espécies e entender melhor suas conseqüências na população humana, onde nem sempre é possível identificar os vários parâmetros da má-nutrição.

A desnutrição provoca efeitos marcantes sobre o desenvolvimento cerebral sob o ponto de vista estrutural (Almeida *et al.*, 1992), neuroquímico (Almeida *et al.*, 1996), resultando também em alterações comportamentais (Strupp e Levitsky, 1995). Os efeitos de má nutrição no início da vida resultam em mudanças no comportamento que persistem até a fase adulta (Franková, 1968).

Os prejuízos à integridade do organismo resultantes da desnutrição podem ser agravados se o insulto nutricional ocorrer na fase de período crítico de desenvolvimento do cérebro. Este período varia de acordo com a espécie e caracteriza-se por uma fase de multiplicação celular mais acentuada, conforme descrito por Dobbing (1968), havendo um aumento considerável de peso cerebral. No rato este período atinge seu pico entre os sete e quatorze dias de idade, perdurando até mais ou menos 35 dias de vida pós-natal (Dobbing, 1968; Morgane *et al.*, 1992, 1993). No homem, o período rápido de desenvolvimento do sistema nervoso se estende desde a gestação (predominantemente nos 3 últimos meses) até os 2,5 anos de idade (Morgane *et al.*, 2002).

Para Morgane *et al.* (2002) o conceito de período crítico relaciona-se com o fato de que a maturação do sistema nervoso é um processo linear que não ocorre em uma rapidez uniforme ao longo dos primeiros dias de vida e representa uma janela de desenvolvimento que pode não se repetir posteriormente. A falta de nutrientes nesse período tem conseqüências graves, embora o Sistema Nervoso Central (SNC) seja mais protegido em relação aos demais órgãos e tecidos do corpo (Dobbing, 1968; Morgane *et al.* 1992, 1993). Assim, a desnutrição

resulta em menor prejuízo ao cérebro, quando comparado com as alterações mais intensas em outros tecidos, como músculos e outros órgãos em geral (fígado, glândulas, coração). Entretanto, esta proteção preferencial do tecido nervoso não impede totalmente que o SNC também sofra alterações.

Em animais desnutridos no início da vida há uma diminuição do tamanho do cérebro, da quantidade de DNA cerebral, da mielinização, além de diminuição dos dendritos corticais, queda no conteúdo de colinesterase e no conteúdo de noradrenalina no cérebro (Levitsky e Barnes, 1972). Por outro lado a serotonina é marcadamente aumentada pela desnutrição no início da vida (Almeida *et al.*, 1996).

Além das alterações comportamentais produzidas pela desnutrição pode-se destacar a elevação, no SNC, da corticosterona plasmática, um glicocorticóide secretado em resposta ao estresse desde o final do período fetal. Os glicocorticóides são geralmente catabólicos, inibindo a divisão celular, síntese protéica e captação de aminoácidos e glicose pelos tecidos. As conseqüências destes eventos são potencialmente sérias para um organismo durante o período no qual predomina o anabolismo (Sapolsky *et al.*, 1986).

As poliaminas, que são cátions alifáticos de baixo peso molecular que ocorrem em quase todas as células do organismo também têm seu metabolismo alterado. As poliaminas a serem avaliadas neste estudo são a putrescina ($H_2N(CH_2)_4NH_2$), espermidina ($H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$) e espermina ($H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$). A putrescina é sintetizada nos mamíferos a partir da *L*-ornitina em uma reação catalisada pela ornitina descarboxilase (ODC), enzima reguladora da síntese de poliaminas. A putrescina e a *s*-adenosilmetionina descarboxilada são substratos para a síntese de espermidina, que é precursora da espermina (Wallace, 2000).

Vários são os papéis fisiológicos atribuídos às poliaminas; elas podem atuar como mensageiro secundário, nutriente, regulador metabólico, fator de crescimento, antioxidante,

estabilizador de DNA, RNA e de membranas (Wallace, 2000). As poliaminas interagem ainda com diferentes canais iônicos participando da modulação de eventos sinápticos plásticos (Williams, 1997). Elas participam ainda de muitos estágios da síntese de ácidos nucleicos, de proteínas e afetam a metilação de RNA transportador (McAnulty e Williams, 1976).

Eventos estressantes, como a má nutrição e a privação sensorial (baixa estimulação ambiental), levam à inibição da atividade da ODC. Níveis insuficientes de poliaminas resultam em crescimento sub-ótimo e, em alguns casos, morte celular, incluindo apoptose. A elevação incontrolada de poliaminas pode levar à transformação celular e favorecer a gênese tumoral (Tabor, 1984).

A desnutrição é na verdade um problema multifatorial e está intimamente relacionada com a pobreza da população, que em geral, enfrenta maiores dificuldades em obter os alimentos mínimos necessários (Morgane *et al.*, 1993). As conseqüências da desnutrição sobre o comportamento de crianças nos primeiros anos de vida não são devidas apenas à falta de nutrientes, mas podem ser agravadas pelas condições precárias do ambiente em que vivem as populações desnutridas, uma vez que são expostos não apenas à falta das condições adequadas para o bom desenvolvimento fisiológico e comportamental, como também a falta de cuidados e atenção dos pais e adultos. Crianças desnutridas geralmente vivem em ambientes com poucos recursos econômicos, onde existem poucos brinquedos e baixa participação dos pais nas atividades de brincadeira das mesmas (Grantham-McGregor, 1995).

A desnutrição precoce pode causar um retardo do desenvolvimento intelectual, entretanto este quadro pode ser parcialmente revertido pela estimulação ambiental (Barnes, 1976). A estimulação tátil e a ambiental promovem várias alterações fisiológicas e bioquímicas no organismo e produzem, como conseqüência, uma melhor adaptação ao ambiente, resultando em uma redução parcial dos efeitos da desnutrição no comportamento de crianças expostas a insultos nutricionais.

Os prejuízos causados pela desnutrição podem ser acentuados pelo isolamento do meio-ambiente (falta de estimulação) e, por outro lado, ser parcialmente atenuados pela estimulação ambiental (Levitsky e Barnes, 1972).

Assim, em contraste com os efeitos benéficos de estimulação ambiental, os efeitos comportamentais da desnutrição precoce são agravados pelo isolamento ambiental. Em ratos desnutridos foi observado que os prejuízos causados pela desnutrição, como, por exemplo, na locomoção e exploração do ambiente, são intensificados quando os mesmos são mantidos em ambientes isolados, com redução da quantidade de estímulos do ambiente. (Franková, 1968). Em ratos previamente desnutridos e que não recebem estimulação tátil (handling) foi observado que a atividade da enzima acetilcolintransferase (envolvida na síntese da acetilcolina) está diminuída, e a atividade da enzima acetilcolinesterase (que hidrolisa acetilcolina), está aumentada. Entretanto, estes efeitos foram atenuados quando os animais foram submetidos à estimulação tátil (Barnes, 1976).

A estimulação tátil leva a uma melhora no desenvolvimento do SNC, principalmente através do aumento de enzimas envolvidas no processo de mielinização, resultando em aumento de atividade espontânea no adulto e alteração da reação a drogas psicotrópicas (Franková, 1968). Ratos que receberam estimulação tátil enquanto filhotes apresentam melhor feedback do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, maior atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) e aumento na arborização dendrítica na região do hipocampo (Field, 1998).

Quanto aos efeitos comportamentais da estimulação ambiental em animais, foi relatado que filhotes desnutridos estimulados apresentam aumento na capacidade de resolução de tarefas, como melhora no desempenho no labirinto Hebb-Williams (Celedón *et al.*, 1979), aumento no limiar de respostas a estímulos aversivos dolorosos (Rocinho *et al.*, 1997), aumento das entradas nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado (Santucci *et al.*, 1994;

Pereira da Silva e De Oliveira, 2005), e menor tempo no lado escuro da caixa em um teste de preferência claro-escuro (Santucci *et al.*, 1994).

Quando se estuda desnutrição nos modelos animais não-humanos, um dos comportamentos avaliados é a atividade exploratória do animal. A importância funcional da exploração é que ela representa uma capacidade filogenética implantada do animal para aprender sobre o novo ambiente ao seu redor e para responder a estímulos ou à mudança no ambiente. Assim, qualquer insulto que comprometa a capacidade do animal em responder a estímulos do meio ambiente influenciará na exploração (Barret *et al.*, 1987).

Mas, apesar de diversos efeitos da desnutrição e da estimulação (ou da falta dela) terem sido avaliados no comportamento do animal adulto, ainda não estão claros na literatura os mecanismos pelos quais a desnutrição precoce e a estimulação ambiental, no início da vida, podem interagir para produzir mudanças, a longo prazo, no comportamento do animal adulto, conforme comentam Levitsky e Barnes (1972).

Schanberg e Field (1987) mostraram que a estimulação tátil em ratos aumentou os níveis da ODC. Como a atividade da enzima ODC é difícil de ser medida, pois requer técnicas laboratoriais complexas, optamos por realizar medidas dos níveis de poliaminas nas estruturas cerebrais e da participação dessas substâncias em diversos processos modificados pela estimulação, avaliando as possíveis conseqüências para o comportamento.

Como os níveis das poliaminas podem ser indicadores indiretos dos efeitos da ODC (Schanberg e Field, 1987), o presente trabalho investigou a atividade exploratória do rato na tábua de buracos tradicional com 4 furos e em uma tábua modificada com o acréscimo de um furo central, bem como as medidas dos níveis de corticosterona plasmática, e as concentrações de poliaminas no estriado e hipocampo de ratos, através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-HPLC).

Dado que a desnutrição no início da vida provoca alterações comportamentais (como alterações na atividade exploratória), e que a estimulação ambiental pode reverter parcialmente tais efeitos da desnutrição, faz-se necessária a obtenção de dados bioquímicos para correlacioná-los com os dados comportamentais.

A corticosterona está aumentada em animais desnutridos adultos, mas não estão claras na literatura as possíveis alterações dos níveis de corticosterona em indivíduos jovens e como elas possam estar relacionadas com as alterações comportamentais. Sabe-se que durante parte do desenvolvimento pós-natal em ratos e camundongos o eixo HPA desses animais apresenta baixa taxa de resposta à maioria dos estímulos. Este período é denominado hiporresponsivo e perdura até aproximadamente o 15º dia de vida pós-natal (Kofman, 2002). As principais características deste período são níveis basais de corticosterona muito baixos e incapacidade de muitos eventos estressores em eliciar uma resposta de secreção de corticosterona (Schmidt *et al.*, 2005). Isso seria devido a um aumento no feedback negativo mediado por receptores glicocorticóides (GR) no eixo HPA.

Como na situação de desnutrição tanto os níveis de corticosterona como os de poliaminas parecem estar alterados e, como não há informações na literatura sobre os efeitos da estimulação tátil nos níveis de corticosterona desses animais, então o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a estimulação tátil pode normalizar esses níveis. Além das medidas bioquímicas investigaram-se também os efeitos tanto da desnutrição precoce quanto da estimulação sobre o comportamento dos ratos na exploração da tábua de buracos.

2. MATERIAL E MÉTODO

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Procedimentos Gerais

Foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP ratos machos e ratas fêmeas virgens com idade aproximada entre 60 e 65 dias, a partir dos quais foram obtidas ninhadas cujos filhotes (machos) foram utilizados nos testes. Os machos foram mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno medindo 41 x 34 x 17 cm, com tampas de grade em aço inoxidável nas quais há espaço para colocação das dietas e bebedouros de plástico. As gaiolas foram forradas com raspas de madeira e a água e a ração comercial foram oferecidas *ad libitum*.

As ratas foram mantidas nas mesmas condições que os machos, porém em grupos de 3 por gaiola durante um período de adaptação (aproximadamente 1 semana); sendo então transferidas para a gaiola dos machos para acasalamento (3 fêmeas para cada macho). As fêmeas foram acompanhadas durante a gestação até o dia do parto, sempre mantidas com ração comercial e água *ad libitum*.

Após o parto, todos os filhotes nascidos em um intervalo de 24 horas foram separados de suas mães e formaram um grupo maior (*pool* de filhotes). Em seguida foram separados por sexo e designados aleatoriamente em grupos de oito animais para cada rata-mãe.

As ninhadas foram compostas por uma rata mãe e 8 filhotes, sendo 6 machos e 2 fêmeas, mantidos em gaiola de acrílico medindo 40 x 30 x 20 cm até o final deste período (21 dias após o nascimento). Após o período da lactação (desmame), as fêmeas e as ratas-mãe foram descartadas.

Após a composição das ninhadas, no dia do nascimento, os animais foram divididos em 4 grupos: Controle Não Estimulado (CN), Controle Estimulado (CE), Desnutrido Não Estimulado (DN) e Desnutrido Estimulado (DE). Os animais dos grupos CN e CE foram

mantidos com dieta de 16% de proteína e os animais do grupo DN e DE foram mantidos com dieta de 6% de proteína.

Estas dietas foram oferecidas até os 36 dias de idade, quando os animais foram testados. A dieta de 16% de proteína contém também 5% de sais minerais, 8% de lipídeos (óleo de milho), 1% de vitaminas, 0,2% de colina e 69,8% de carboidratos (amido de milho - maisena). A dieta de 6% de proteína contém as mesmas proporções de sais minerais, vitaminas e colina, sendo o carboidrato aumentado para 79,8% para manter as dietas isocalóricas. Também é acrescentada L-metionina (2,0 g; Kg de proteína), uma vez que a caseína é deficiente nesse aminoácido. As dietas foram preparadas no próprio Laboratório de Nutrição, Desenvolvimento e Comportamento, respeitando as proporções de nutrientes recomendadas pela AIN (American Institute of Nutrition) e AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) como descrito por Reeves *et al.* (1993) e Rocinholi *et al.* (1997). As dietas e água foram oferecidas *ad libitum* até os 36 dias de vida.

Durante a lactação foram estudados, portanto, 4 grupos, envolvendo as variáveis dieta e estimulação, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Descrição das condições ambientais e de dietas nos vários grupos durante o período da lactação (de 0 a 21 dias de idade). Grupos: Controle Não Estimulado (CN), Controle Estimulado (CE), Desnutrido Não Estimulado (DN) e Desnutrido Estimulado (DE).

GRUPOS	TRATAMENTO EXPERIMENTAL	
	DIETAS	CONDIÇÕES AMBIENTAIS
CN	Dieta 16% de proteína	Não-estimulados
CE	Dieta 16% de proteína	Estimulados
DN	Dieta 6% de proteína	Não-estimulados
DE	Dieta 6% de proteína	Estimulados

Os ratos machos, após o período da lactação (21 dias), foram separados de suas ratas-mãe e colocados em gaiolas individuais de polipropileno medindo 30 x 19 x 13 cm, com tampas de aço inoxidável e bebedouros de plástico acoplados. Para cada um dos quatro grupos acima citados, foram preparados animais para serem testados (aos 36 dias de vida) na Tábua de Buracos de 4 furos, e animais que não foram submetidos a teste comportamental algum. Além disso, também foram preparados animais para serem testados na tábua de buracos de 5 furos, formando 12 grupos; conforme descrito na Quadro 2.

A estimulação diária iniciou-se no dia do nascimento e consistiu em segurar o rato com uma das mãos e, deslizar o polegar da outra mão sobre o dorso do animal no sentido céfalo-caudal por 3 minutos (handling). Em seguida a ninhada foi recolocada em uma gaiola e levada para uma sala onde foi exposta a sons de 3Khz e 50dB por 3 minutos a intervalos regulares de 25 segundos. Depois do desmame os animais passaram a viver em gaiolas individuais, sendo mantido o mesmo procedimento de estimulação até 35 dias de idade.

Quadro 2 – Descrição das condições ambientais, realização ou não de teste comportamental e das dietas dos grupos durante o período da pós-lactação (21 a 35 dias de idade): Controle Não Estimulado Não-Testado (CNN), Controle Não-Estimulado Testado-Tábua de 4 furos (CNT4), Controle Não-Estimulado Testado-Tábua de 5 furos (CNT5), Controle Estimulado Não-Testado (CEN), Controle Estimulado Testado-Tábua de 4 furos (CET4), Controle Estimulado Testado-Tábua de 5 furos (CET5), Desnutrido Não Estimulado Não-Testado (DNN), Desnutrido Não-Estimulado Testado-Tábua de 4 furos (DNT4), Desnutrido Não-Estimulado Testado-Tábua de 5 furos (DNT5), Desnutrido Estimulado Não-Testado (DEN), Desnutrido Estimulado Testado-Tábua de 4 furos (DET4), Desnutrido Estimulado Testado-Tábua de 5 furos (DET5). N = não; S = sim; n = número de animais por grupo experimental.

Grupos	Dieta	Estimulação	Teste	n
CNN	16%	N	N	8
CNT4	16%	N	S	8
CNT5	16%	N	S	8
CEN	16%	S	N	8
CET4	16%	S	S	8
CET5	16%	S	S	8
DNN	6%	N	N	8
DNT4	6%	N	S	8
DNT5	6%	N	S	8
DEN	6%	S	N	8
DET4	6%	S	S	8
DET5	6%	S	S	8

2.2. Medidas comportamentais

No 36º dia de vida a atividade exploratória dos animais foi avaliada através da tábua de buracos de 4 furos, para grupos independentes de animais desnutridos ou controles, com ou sem estimulação. Neste teste, os animais foram retirados individualmente de suas gaiolas-

viveiro e cada um deles foi colocado na porção mediana de uma das laterais no fundo da caixa.

A caixa experimental mede 65 x 55 x 46 cm, com quatro paredes de acrílico (opaco) cinza um assoalho preto removível também em acrílico, com quatro furos, um em cada canto da caixa. No teste a que foram submetidos os animais desnutridos, foi utilizado um assoalho cujos buracos eram de 2 cm de diâmetro; já para os animais controles, o diâmetro dos buracos era de 3 cm.

Abaixo de cada buraco foi adaptada uma fotocélula para registrar a exploração (atividade “*nose poken*”) tanto frequência como duração. O período de teste foi de 5 minutos para cada animal. A caixa de teste foi acoplada a um computador através de uma interface de 64 canais para que os dados de exploração obtidos no experimento pudessem ser armazenados e posteriormente analisados.

Outros grupos de animais desnutridos ou controles, estimulados ou não, foram submetidos, também aos 36 dias de vida, ao teste da Tábua de Buracos de 5 Furos. O equipamento utilizado foi o mesmo descrito para o teste da Tábua de Buracos de 4 furos, porém, o assoalho do equipamento, além dos 4 furos laterais, continha um furo central. Neste teste, o assoalho também era removível, sendo que para os animais controles os furos tinham 3cm de diâmetro e para os desnutridos, 2 cm.

2.3. Medidas bioquímicas

No 36º dia de vida, trinta minutos após os testes na Tábua de Buracos, os animais foram sacrificados tendo seu sangue coletado, centrifugado e o sobrenadante congelado a -70° C para posterior análise bioquímica da corticosterona no Laboratório do Departamento de Fisiologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, sob a orientação da Profª. Drª. Lucila Leico Kagohara Elias. A técnica utilizada para a análise dos níveis de

corticosterona plasmática foi a de radioimunoensaio, conforme descrito no trabalho de Elias *et al.* (1997).

A coleta de sangue, segundo a metodologia utilizada só pôde ser realizada no período das 8 às 10 horas, o que limitou o número de coletas que puderam ser realizadas em um dia. Após a decapitação, concomitantemente à coleta do sangue, o cérebro de cada animal foi dissecado para separação do hipocampo e estriado. As estruturas cerebrais retiradas foram pesadas (a fresco) e armazenadas em ependorfs a -70° C para posterior análise das poliaminas no equipamento de HPLC do Laboratório de Nutrição do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, sob orientação o Prof. Dr Prof. Dr. Sérgio Marchini, utilizando-se da adaptação de um método descrito por Löser *et al.*(1988).

3. ANÁLISE DOS DADOS

3. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados de peso corporal, de comportamento e bioquímico foram submetidos ao teste de Kilmogorov-Smirnov para análise da distribuição normal. Após a constatação da normalidade dos dados, todos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de três fatores seguido, quando necessário, da análise *post-hoc*, realizando o teste de Newman-Keuls.

Os fatores presentes na análise dos dados de massa corporal foram dieta, estimulação e dia. Na análise dos dados comportamentais obtidos na tábua de buracos (4 e 5 furos), os fatores foram dieta, estimulação e minuto. Já para os dados bioquímicos os três fatores foram dieta x estimulação x teste comportamental.

Para a análise dos dados foi utilizado o programa Statistica, versão 6.0; e foi considerado nível de significância um valor de $\alpha < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Peso Corporal

Rata-mãe

O peso corporal das ratas-mãe foi aferido semanalmente, desde o dia do parto (dia zero) até o último dia da lactação (dia 21). A análise dos dados mostra um efeito significativo do fator dieta [$F_{(1,00)} = 46,38$; $p < 0,05$], com as ratas-mãe desnutridas apresentando menor peso corporal quando comparadas com as ratas-mãe controles (Figura 1).

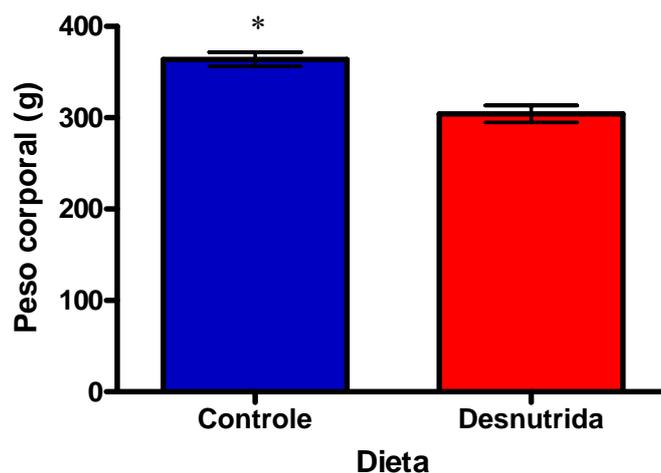


Figura 1 - Média do peso corporal (g) das ratas-mãe Controle (n = 13) e Desnutridas (n = 13) durante o período da lactação. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo desnutrido.

Foi possível observar também um efeito significativo do fator dia da lactação [$F_{(3,00)} = 32,70$; $p < 0,05$]. As ratas-mãe perderam peso corporal ao longo do período de lactação, independentemente do tipo de dieta oferecida ou da condição de estimulação (Figura 2).

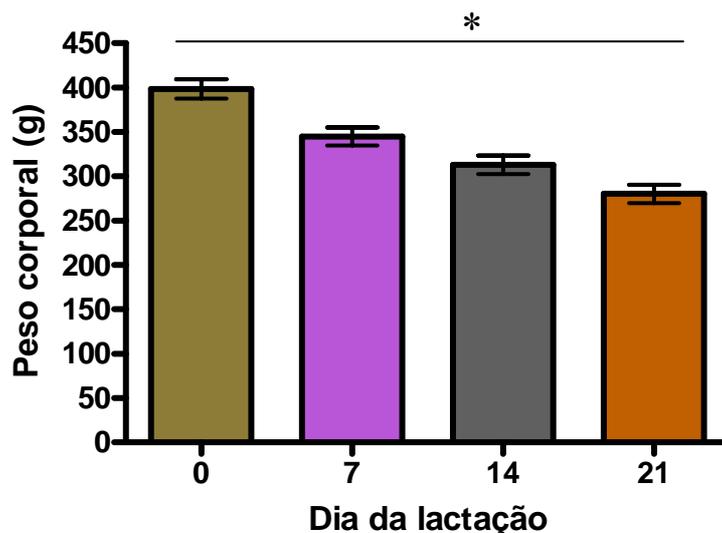


Figura 2 – Média de peso corporal (g) das ratas-mãe (n = 26) ao longo do período da lactação. As linhas verticais presentes em cada barra do gráfico representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em todas as comparações entre os dias da lactação.

Filhotes

Os filhotes de cada ninhada foram pesados semanalmente, desde o dia do nascimento (dia zero) até o final da lactação (21 dias de vida). A análise dos dados mostra um aumento significativo de peso corporal durante o período da lactação, evidenciando um efeito significativo do fator dia de vida [$F_{(3,00)} = 470,30$; $p < 0,001$] (Figura 3).

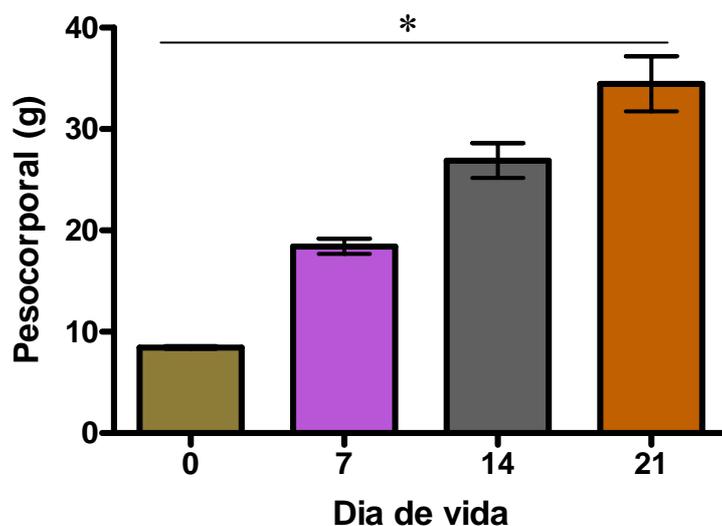


Figura 3 - Média de peso corporal (g) dos filhotes (n = 96) ao longo do período da lactação. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação em todas as comparações entre os dias da lactação.

Os dados também mostram diferença significativa do fator dieta [$F_{(1,00)} = 549,72$; $p < 0,001$], com os animais controles apresentando maiores pesos corporais quando comparados aos animais desnutridos (Figura 4).

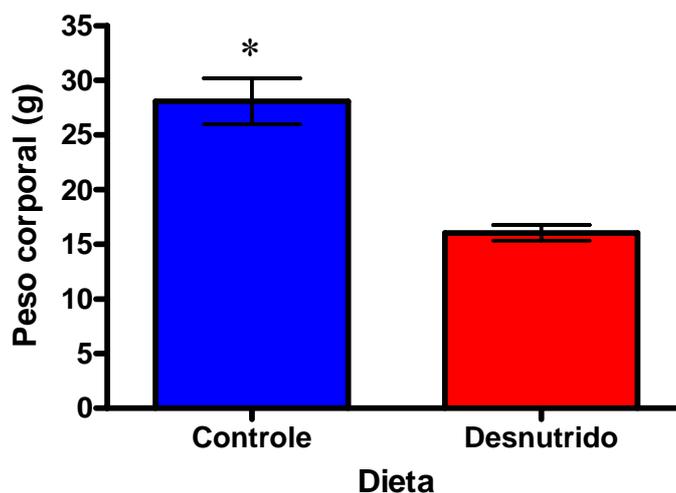


Figura 4 - Média de peso corporal (g) dos filhotes Controles (n = 48) e Desnutridos (n = 48) durante a lactação. As linhas verticais presentes em cada barra do gráfico representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo desnutrido.

Foi possível constatar ainda interação entre os fatores dieta e dia de vida [$F_{(7,00)} = 126,42$; $p < 0,001$] no peso dos filhotes. No dia do nascimento não havia diferença significativa entre o peso corporal médio dos filhotes controles e desnutridos. Mas a partir da segunda pesagem (7 dias de vida) o peso corporal dos ratos controles foi maior que o peso dos desnutridos, mostrando claramente o efeito da dieta (Figura 5).

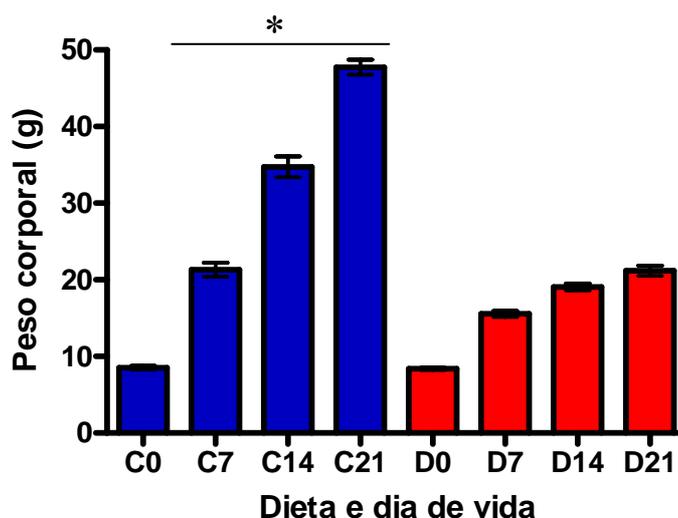


Figura 5 - Média de peso corporal (g) semanal dos filhotes controles (n = 48) e filhotes desnutridos (n = 48) nos dias zero (D0), dia 7 (D7), dia14 (D14) e dia 21 (D21) do período da lactação. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao desnutrido, a partir do dia 7.

Após a lactação os animais foram pesados individualmente a cada sete dias, e os animais continuaram apresentando aumento de peso corporal, mostrando influência do fator dia de vida [$F_{(2,00)} = 791,92$; $p < 0,05$], havendo um aumento significativo de peso em cada dia do período de pós-lactação (Figura 6).

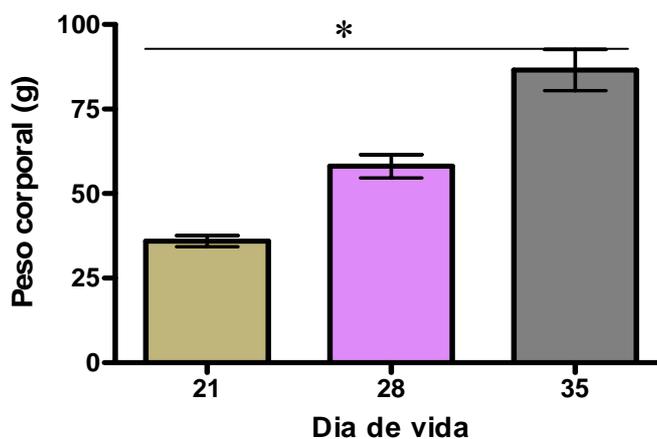


Figura 6 - Média de peso corporal (g) dos animais (n = 96) após o período da lactação. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em todas as comparações entre os dias da pós-lactação.

Observou-se ainda um efeito significativo do fator dieta [$F_{(1,00)} = 4608,38$; $p < 0,05$] com os controles mostrando maior peso corporal que os desnutridos (Figura 7).

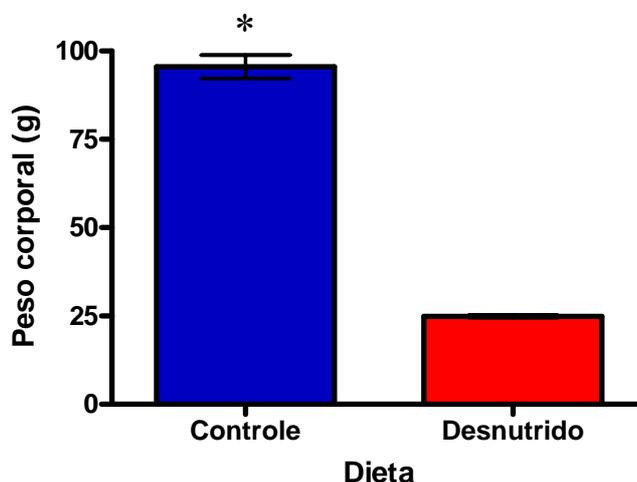


Figura 7 - Média de peso corporal (g) dos animais Controle ($n = 48$) e Desnutrido ($n = 48$) após a lactação. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo desnutrido.

Pôde-se observar ainda uma interação significativa entre os fatores dieta e dias de vida [$F_{(5,00)} = 571,66$; $p < 0,05$]. As diferenças entre desnutridos e controles foram significativas em todas as pesagens. Entre os controles, as diferenças de peso corporal foram significativas em todos os dias de pesagens. Entre os desnutridos, essa diferença não foi observada entre os dias 28 e 35 de vida, mostrando não ter havido um ganho significativo de peso entre esses dois dias (Figura 8).

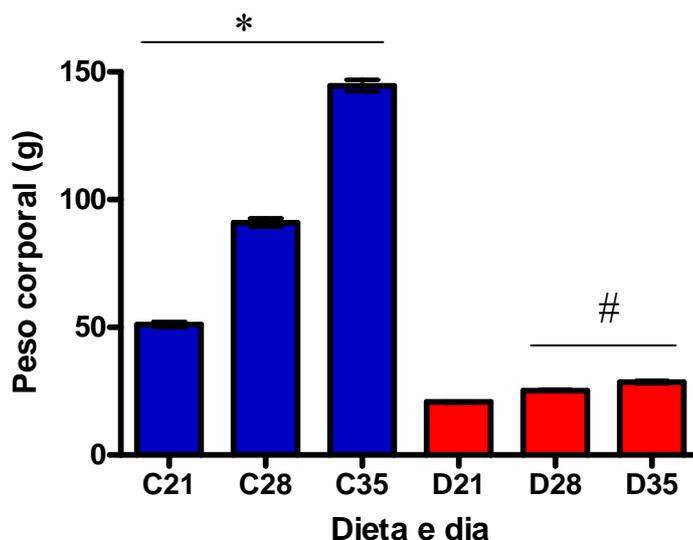


Figura 8 - Média de peso corporal (g) semanal dos animais controles (n = 48) no dia 21 (C21), dia 28 (C28) e dia 35 (C35) e filhotes desnutridos (n = 48) no dia 21 (D21), dia 28 (D28) e dia 35 (D35) após o período da lactação. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação a cada dia de pesagem entre os controle, e # $p < 0,05$ em relação ao D21.

4.2. Dados comportamentais

Tábua de Buracos com 4 Furos

Neste teste foi analisada primeiramente a frequência das visitas aos buracos da caixa experimental. Os dados mostraram que houve um efeito significativo de dieta [$F(1,00) = 8,36$; $p < 0,05$] sobre o número de visitas realizadas. Os animais controles, estimulados ou não, mostraram maior número de visitas que os desnutridos (Figura 9).

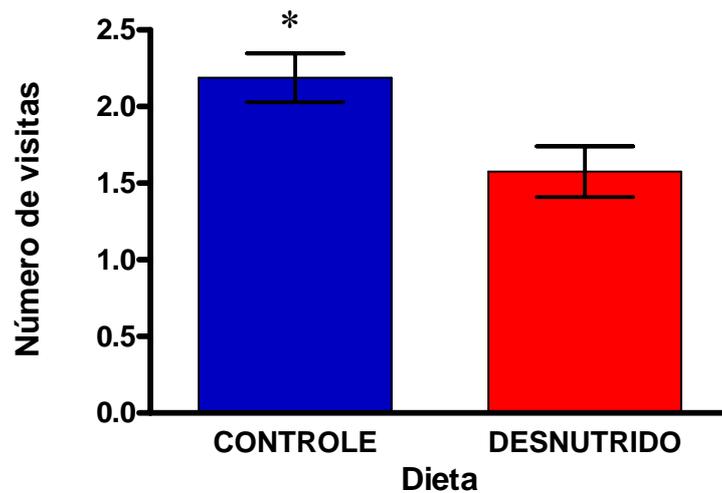


Figura 9 – Número médio de visitas realizadas aos furos da tábua de buracos com 4 furos pelos animais Controle (n = 48) e Desnutrido (n = 48). As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * p < 0,05 em relação ao grupo desnutrido.

A estimulação aumentou a freqüência das visitas aos buracos da caixa [$F_{(1,00)} = 7,06$; p < 0,05], tanto nos animais controles como nos desnutridos (Figura 10).

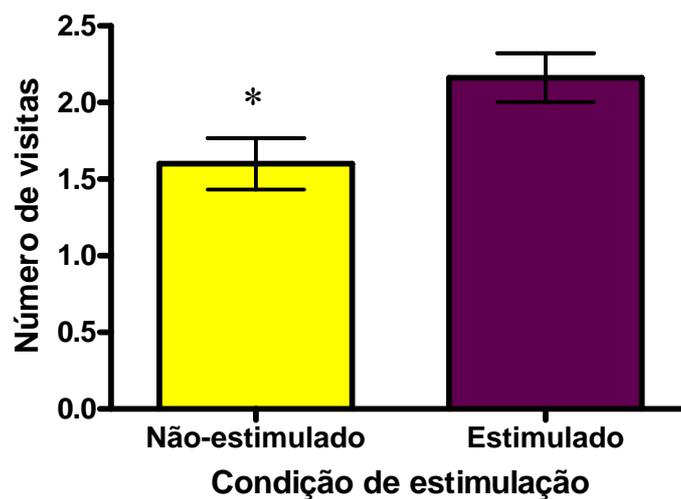


Figura 10 - Número médio de visitas realizadas aos furos da tábua de buracos com 4 furos pelos animais Não-estimulados (n = 48) e Estimulados (n = 48). As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * p < 0,05 em relação ao grupo estimulado.

Foi possível também verificar uma interação entre dieta e estimulação [$F_{(3,00)} = 1,02$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* mostrou que o grupo DN apresentou uma menor frequência de visitas que os demais grupos (Figura 11).

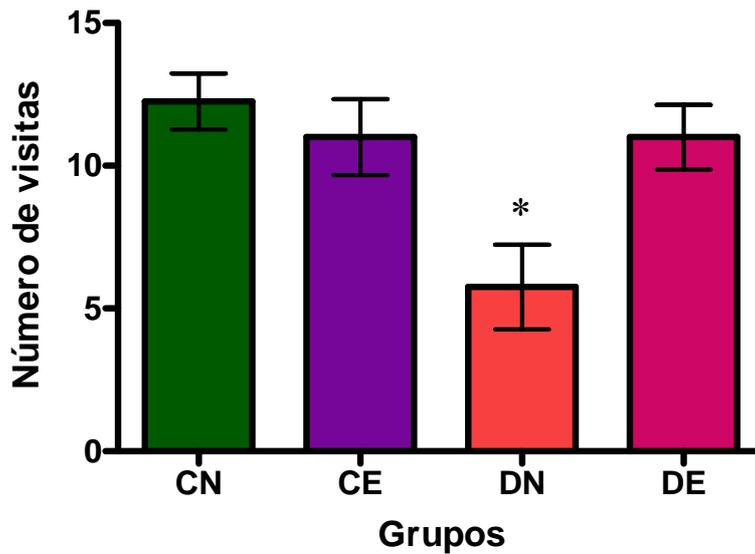


Figura 11 - Número médio de visitas realizadas aos furos da tábua de buracos de 4 furos ($n=8$ para todos os grupos. CN = Controle Não-estimulado, CE = Controle Estimulado, DN = Desnutrido Não Estimulado e DE = Desnutrido Estimulado. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

Quando se analisa, minuto a minuto, o número de visitas na Tábua de 4 Furos, observa-se um efeito significativo do fator minuto [$F_{(4,00)} = 1,06$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* mostra menor número de visitas no 5º minuto quando comparado aos demais, exceto no 3º minuto (Figura 12).

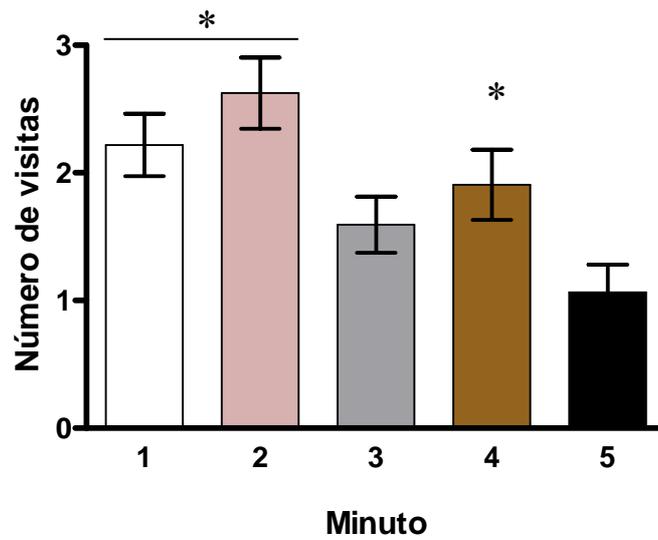


Figura 12 – Número médio de visitas, minuto a minuto, realizadas aos furos da tábua de buracos de 4 furos ($n = 96$). As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao minuto 5.

A duração das visitas aos furos da Tábua de Buracos da Tábua de 4 Furos também foi analisada. Os dados mostram que houve um efeito significativo do fator estimulação [$F_{(1,00)} = 9,01$; $p < 0,05$], com os animais estimulados mostrando uma maior duração das visitas quando comparados aos animais não-estimulados (Figura 13).

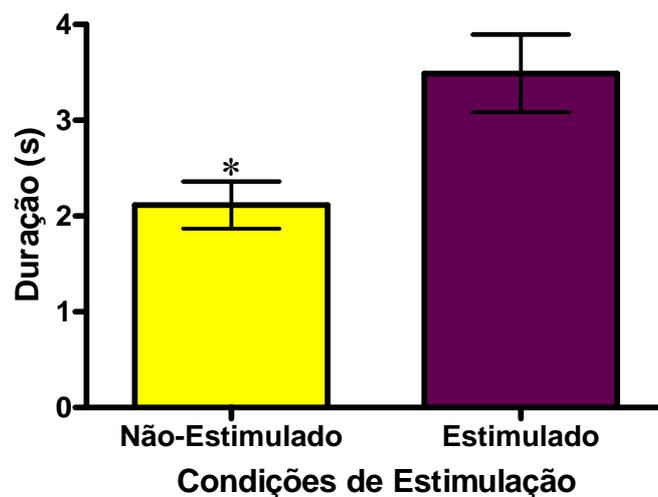


Figura 13 – Duração média das visitas (segundos) aos furos da tábua de buracos de 4 furos realizadas pelos animais Não-estimulados ($n = 48$) e Estimulados ($n = 48$). As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo estimulado.

Houve ainda interação entre os fatores dieta e estimulação [$F_{(3,00)} = 9,10$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* mostrou que nos animais controles a estimulação não alterou a duração das visitas, enquanto nos animais desnutridos a estimulação aumentou significativamente a duração das visitas (Figura 14).

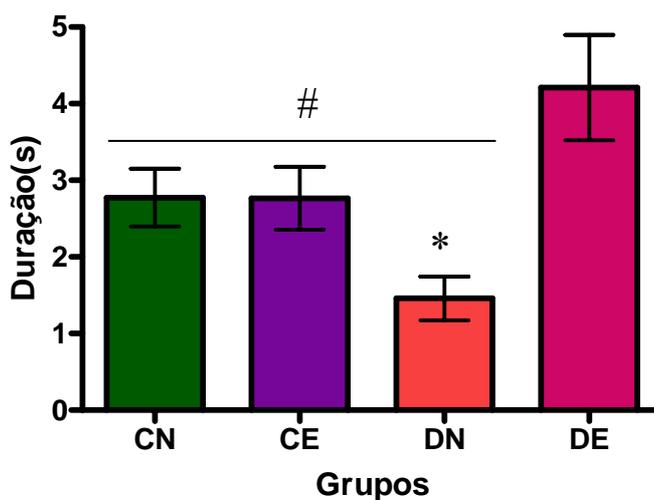


Figura 14 – Duração média das visitas realizadas aos furos da tábua de buracos de 4 furos ($n=8$ para todos os grupos) CN = Controle Não-estimulado, CE = Controle Estimulado, DN = Desnutrido Não-Estimulado e DE = Desnutrido Estimulado. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos, e # $p < 0,05$ em relação ao grupo DE.

Tábua de Buracos de 5 Furos

Foi realizada uma análise de dados de maneira semelhante àquela realizada para a Tábua de Buracos de 4 Furos, como descrito acima. A única diferença reside no fato de que foi realizada uma análise da frequência e duração das visitas também para o furo central.

Foi possível observar um efeito significativo do fator dieta [$F_{(1,00)} = 64,85$; $p < 0,05$] na exploração dos furos laterais, com os animais controles apresentando um maior número de visitas quando comparados aos animais desnutridos (Figura 15).

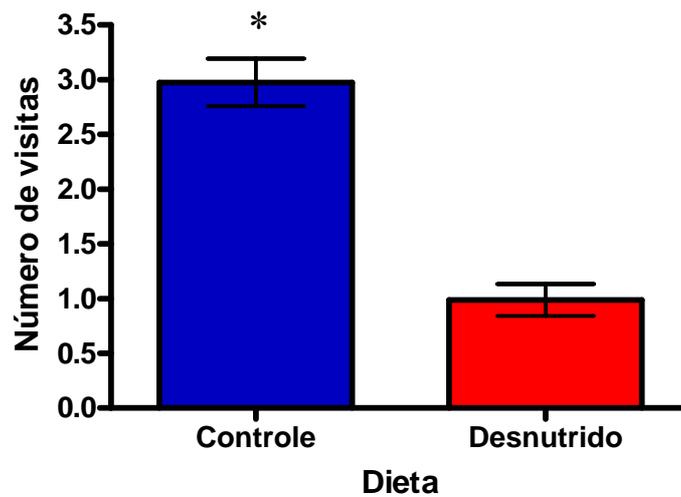


Figura 15 - Número médio de visitas aos buracos laterais realizadas pelos animais controles ($n = 48$) e desnutridos ($n = 48$) no teste da Tábua de Buracos de 5 Furos. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo desnutrido.

Observa-se ainda um efeito significativo do fator estimulação [$F_{(1,00)} = 19,41$; $p < 0,05$], com os animais estimulados explorando mais que os não-estimulados (Figura 16).

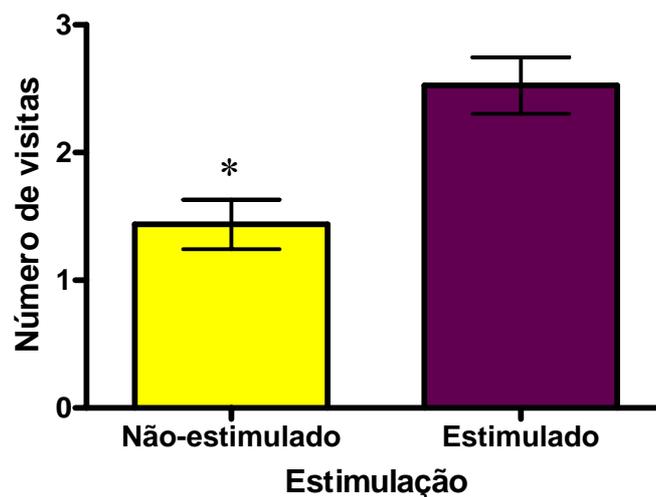


Figura 16 - Número médio de visitas aos buracos laterais realizadas pelos animais Não-estimulados ($n = 48$) e Estimulados ($n = 48$) no teste da Tábua de Buracos de 5 Furos. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo estimulado.

A frequência das visitas aos buracos laterais da caixa começa a diminuir a partir do 4º minuto de teste e no 5º minuto ela é significativamente menor do que no início do teste (1º minuto) [$F_{(4,00)} = 2,67$; $p < 0,05$] (Figura 17).

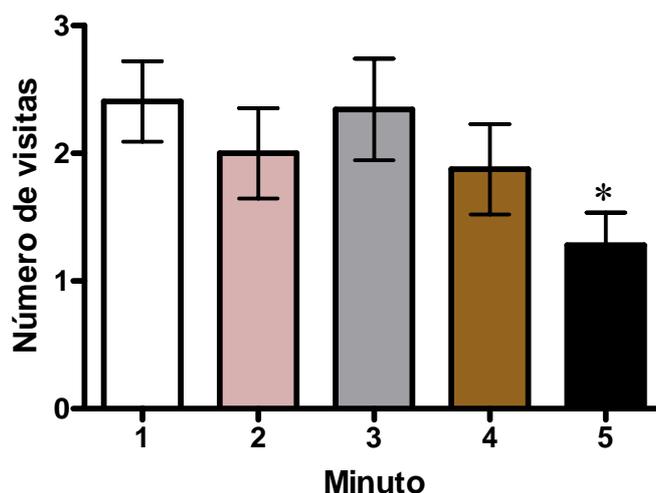


Figura 17 - Número médio de visitas, minuto a minuto, aos furos laterais da tábua de buracos de 5 furos pelos animais dos diversos grupos ($n = 96$). As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ do minuto 5 em relação ao minuto 1.

Quando se analisam as visitas ao buraco central da Tabua de Buracos de 5 Furos nota-se claramente um efeito do fator estimulação [$F_{(1,00)} = 17,68$; $p < 0,05$]. Os animais estimulados visitaram o furo central com uma frequência maior, que os não-estimulados (Figura 18).

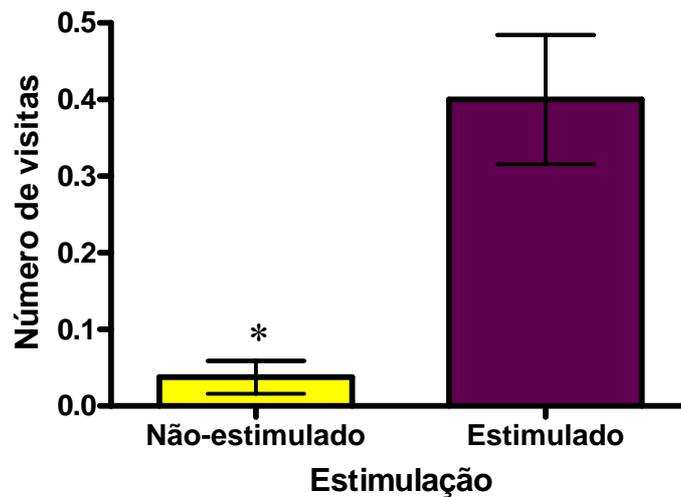


Figura 18 - Número médio de visitas ao buraco central pelos animais Não-estimulados ($n = 48$) e Estimulados ($n = 48$) no teste da Tábua de Buracos de 5 Furos. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo estimulado.

De maneira análoga à análise dos dados do Teste da Tábua de 4 Furos, foi feita uma análise da duração das visitas aos buracos laterais quanto ao buraco central da Tábua de Buracos de 5 Furos.

A duração das visitas aos buracos laterais foi influenciada pelo fator dieta [$F_{(1,00)} = 56,30$; $p < 0,05$], sendo maior entre os controles quando comparados aos desnutridos (Figura 19).

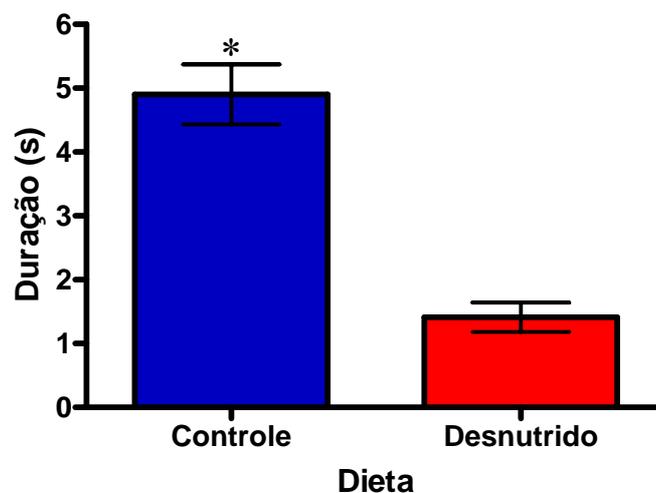


Figura 19 – Duração média das visitas aos buracos laterais realizadas pelos animais controles ($n = 48$) e desnutridos ($n = 48$) no teste da Tábua de Buracos de 5 Furos. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo desnutrido.

Foi possível ainda observar um efeito do fator estimulação sobre a duração das visitas aos buracos laterais da Tábua de Buracos de 5 Furos [$F_{(1,00)} = 19,95$; $p < 0,05$]. Os animais estimulados visitaram os furos laterais por um maior período de tempo que os não-estimulados (Figura 20).

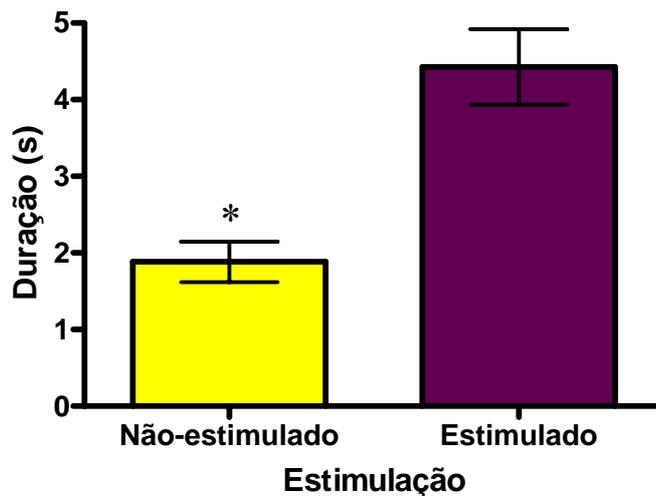


Figura 20 - Duração média de visitas aos buracos laterais realizadas pelos animais Não-estimulados ($n = 48$) e Estimulados ($n = 48$) no teste da Tábua de Buracos de 5 Furos. As linhas verticais presentes em cada uma das barras do gráfico representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo estimulado.

Houve também interação entre os fatores dieta e estimulação [$F_{(3,00)} = 8,29$; $p < 0,05$].

A estimulação aumentou a duração das visitas entre os animais controles, mas não entre os animais desnutridos (Figura 21).

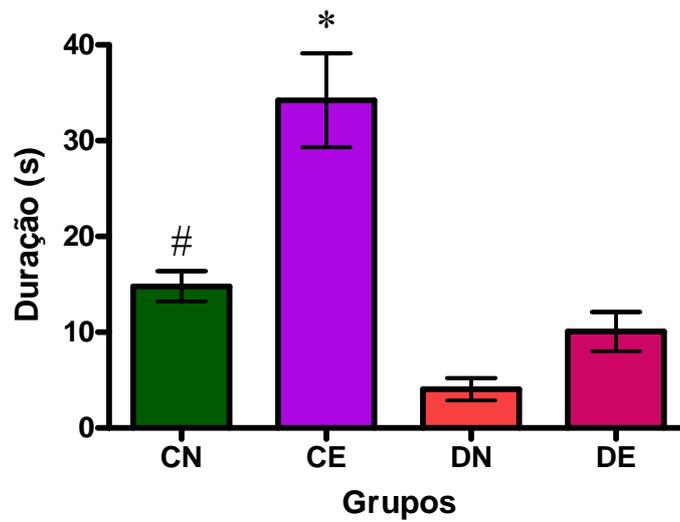


Figura 21 - Duração média das visitas realizadas pelos animais aos furos laterais da tábua de buracos de 5 furos (n=8 em todos os grupos). CN = Controle Não-estimulado, CE = Controle Estimulado, DN – Desnutrido Não-Estimulado e DE = Desnutrido Estimulado. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. # $p < 0,05$ em relação ao grupo DN.

Quando se analisa a duração das visitas ao furo central encontra-se novamente um efeito do fator estimulação [$F_{(1,00)} = 11,52$; $p < 0,05$]. Os animais estimulados realizaram visitas mais longas ao buraco central do que os animais não-estimulados (Figura 22).

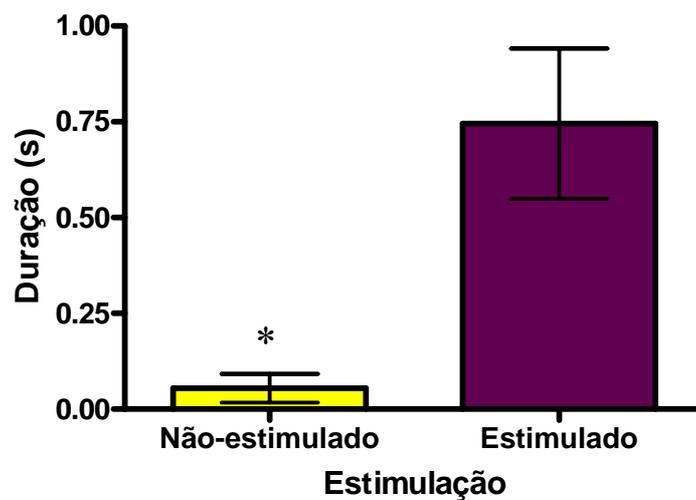


Figura 22 - Duração média de visitas ao buraco central pelos animais Não-estimulados (n = 48) e Estimulados (n = 48) no teste da Tábua de Buracos de 5 Furos. As linhas verticais presentes em cada barra representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo estimulado.

4.3. Dados bioquímicos

Corticosterona plasmática

Foram analisados os níveis de corticosterona plasmática dos animais submetidos ao teste da tábua de buracos de 5 furos e dos animais não submetidos a teste algum. Foi possível observar um efeito significativo do fator estimulação [$F_{(1,00)} = 9,84$; $p < 0,05$], com os animais não estimulados apresentando maiores concentrações quando comparados aos animais estimulados (Figura 23).

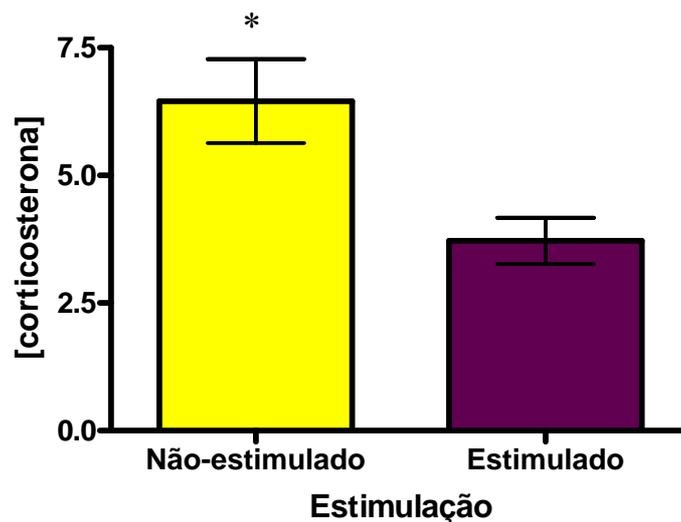


Figura 23 – Concentração de corticosterona plasmática (μl corticosterona/dl de plasma sanguíneo) em animais não-estimulados ($n = 48$) e estimulados ($n = 46$). A linha vertical em cada barra representa o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo estimulado.

Quando foi analisado o fator teste, encontrou-se novamente uma diferença significativa [$F_{(1,00)} = 4,69$; $p < 0,05$], com os níveis de corticosterona plasmática sendo maiores para os animais submetidos ao teste quando comparados aos animais não submetidos ao teste (Figura 24).

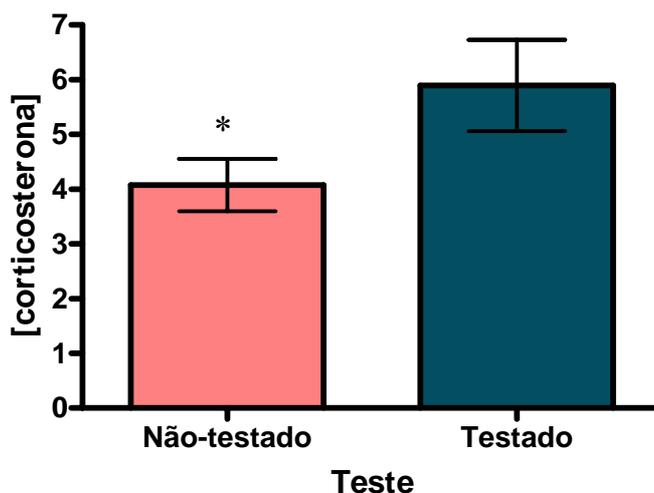


Figura 24 - Concentração de corticosterona plasmática (μl corticosterona/dl de plasma sanguíneo) em animais não-testados ($n = 47$) e testados ($n = 47$). A linha vertical em cada barra representa o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo testado.

Houve ainda interação entre os fatores estimulação e teste [$F_{(3,00)} = 4,75$; $p < 0,05$], com os animais do grupo não-estimulado e testados apresentando maior concentração de corticosterona no plasma sanguíneo do que os demais animais (Figura 25).

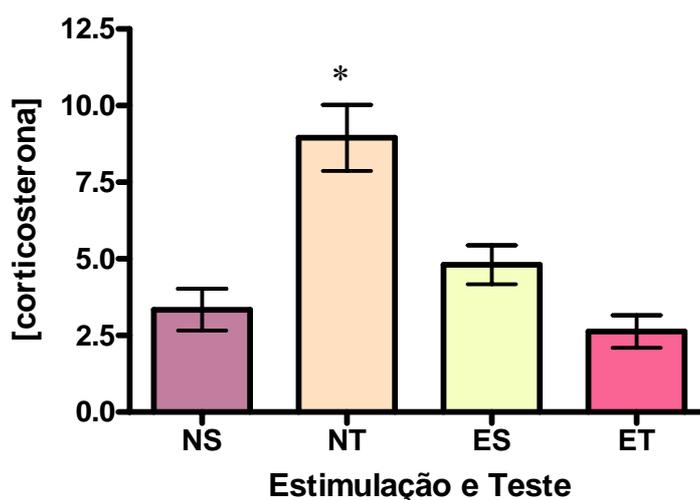


Figura 25 - Concentração de corticosterona plasmática (μl corticosterona/dl de plasma sanguíneo) em animais não-estimulados não testados (NS - $n = 24$), não-estimulados testados (NT - $n = 24$), estimulados não-testados (ES - $n = 23$) e estimulados testados (ET - $n = 23$). A linha vertical em cada barra representa o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

Poliaminas

Os níveis de poliaminas cerebrais nas células do hipocampo e do estriado também foram analisados.

Foi encontrada diferença significativa do fator teste [$F_{(1,00)} = 12,65$; $p < 0,05$] na razão espermidina/espermina nas células do estriado. Os animais que não foram submetidos ao teste da tábua de buracos apresentaram maior taxa espermidina/espermina (1,87) do que os animais submetidos ao teste da tábua de buracos de 5 furos (1,40) (Figura 26).

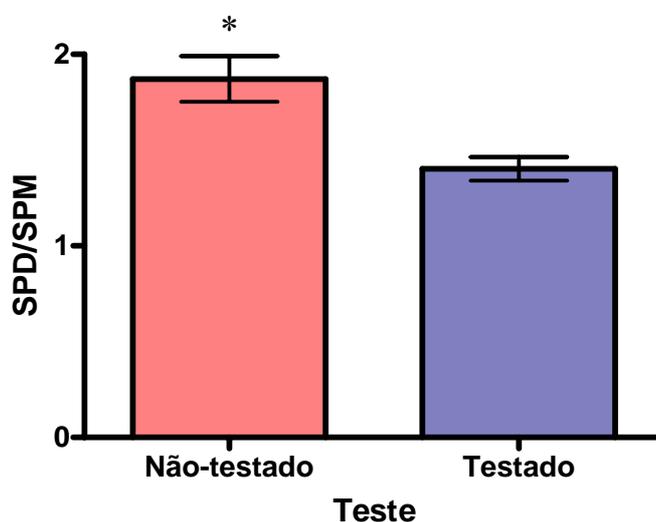


Figura 26 – Taxa de espermidina/espermina (SPD/SPM) nas células do estriado em animais não-testados ($n = 47$) e testados ($n = 47$). A linha vertical em cada barra representa o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo testado.

Foi observado também interação entre os fatores estimulação e teste sobre a razão espermidina/espermina nas células do estriado [$F_{(3,00)} = 12,65$; $p < 0,05$]. Os animais estimulados submetidos ao teste (T4 ou T5), independente do estado nutricional, apresentaram valor da razão spermidina/espermina menor do que os animais não submetidos ao teste sejam eles desnutridos ou controles, estimulados ou não (Figura 27).

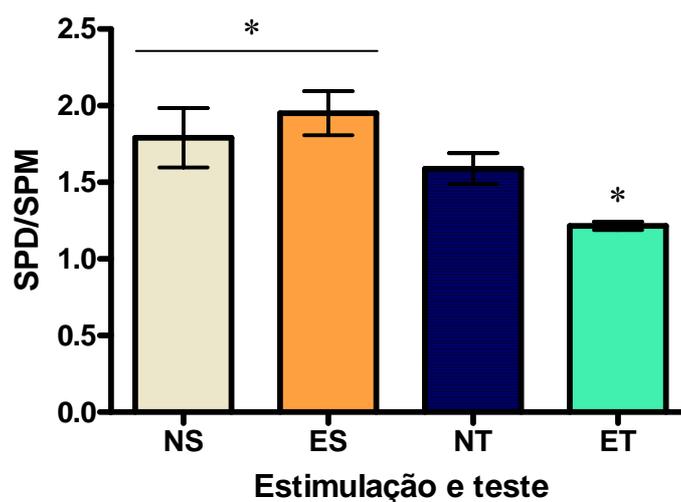


Figura 27 – Taxa de espermidina/espermina (SPD/SPM) nas células do estriado em animais não-estimulados não testados (NS – n = 24), não-estimulados testados (NT – n = 24), estimulados não-testados (ES – n = 23) e estimulados testados (ET – n = 23). A linha vertical em cada barra representa o erro padrão da média (EPM). * p < 0,05 em relação ao grupo ET.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Peso corporal

A perda de peso corporal das ratas-mãe ao longo do período da lactação pode ser devido à amamentação dos filhotes e perda de reservas acumuladas durante a gestação. A maior perda de peso nas ratas desnutridas em comparação às controles está de acordo com estudos anteriores do Laboratório de Nutrição, Desenvolvimento e Comportamento (Rocinholi *et al.*, 1997; Riul *et al.*, 1998; Pereira-da Silva *et al.*, 2005), refletindo o déficit nutricional ocasionado pela dieta pobre em proteína.

Os animais desnutridos apresentaram ganho de peso menor que os controles tanto durante a lactação como a pós-lactação, o que também está em conformidade com estudos prévios deste laboratório (Rocinholi *et al.*, 1997; Riul *et al.*, 1998; Pereira-da Silva *et al.*, 2005).

A estimulação não exerceu influência significativa no peso corporal das ratas-mãe durante a lactação. A estimulação aumentou significativamente apenas o peso corporal dos filhotes durante o período da lactação, semelhante ao que foi observado no trabalho de Levine (1957).

5.2. Dados comportamentais

O comportamento exploratório foi analisado através dos dados obtidos tanto na tábua de buracos de 4 furos (T4) como nos dados de visitas aos buracos laterais da Tábua de Buracos de 5 furos (T5).

A análise da atividade exploratória através da Tábua de Buracos de 4 Furos é bem documentada em literatura. A proposta deste trabalho, ao adicionar um quinto furo na região central do equipamento de teste foi o de investigar também medidas que pudessem ser

indicativas de ansiedade, uma vez que o buraco central é consideravelmente mais aversivo que os laterais, pois estes últimos encontram-se próximos às paredes da caixa, o que representaria para o animal uma relativa proteção contra o ataque de predadores, comportamento esse denominado de tigmotaxia. Tal estratégia mostrou-se eficiente em estudo prévio realizado neste laboratório (De Campos, 2006).

Pôde-se observar um efeito de dieta tanto na exploração das áreas laterais da T5 como na T4. De maneira geral, os animais controles apresentaram visitas mais frequentes (T4 e T5) e de maior duração (T5) que os desnutridos, o que mostra claramente os prejuízos da dieta de 6% de proteína sobre o comportamento de exploração nesse teste. Portanto, a desnutrição diminuiu a atividade exploratória dos animais, diferentemente do que foi encontrado por Alamy *et al.* (2005), que usando dieta restrita em quantidade (50% de restrição durante a lactação e 40% de restrição após a lactação), observaram um aumento na atividade exploratória no teste de campo aberto. No experimento de Alamy *et al.* (2005) o aumento da atividade total no campo aberto (cruzamentos e levantamentos) em ratos desnutridos poderia estar refletindo uma busca ativa por comida, em consequência do tratamento nutricional, uma vez que nesse procedimento há uma sobreposição entre desnutrição e privação alimentar.

Lieberman *et al.* (2005) trabalhando com animais desnutridos (dieta 4% de proteína) e controles (dieta 20% de proteína) encontraram aumento da atividade exploratória no labirinto em cruz elevado, porém apenas sob condições hipertérmicas. Já Lukoyanov *et al.* (2000) não encontraram diferenças na atividade exploratória entre desnutridos (dieta 8% de caseína) e controles (dieta 17% de proteína) no campo aberto. Os dados do presente trabalho que mostram uma diminuição da atividade exploratória decorrentes da desnutrição protéica precoce estão de acordo com dados anteriores descritos por Frankova (1968).

É importante salientar que a desnutrição diminuiu a atividade exploratória dos ratos, diferentemente do que foi relatado em diversos trabalhos em literatura, essa diferença nos

resultados pode ser devida a uma série de fatores, tais como a duração da restrição nutricional, que foi de 35 dias (teste comportamental no 36º dia de vida), enquanto que a maioria dos trabalhos acima citados, os animais eram testados já em idade adulta e após um período de recuperação nutricional. Além disso, os testes comportamentais aplicados nesses diferem do teste utilizado no presente trabalho.

Embora a exploração seja afetada pela ansiedade, como mostraram File e Wardell (1975) através do uso de ansiolíticos, a atividade exploratória e a reatividade emocional são consideradas dimensões independentes, mais do que extremos de uma mesma variável (Schijver *et al.*, 2002). O estudo da exploração através do teste da tábua de buracos mostrou-se eficiente na separação dessas medidas (De Campos, 2006).

No Teste da tábua de buracos de 5 furos, a análise das visitas ao furo central mostra claramente um efeito da estimulação (handling) na ansiedade, uma vez que foi possível observar um aumento significativo tanto na frequência quanto na duração das visitas ao buraco central nos animais estimulados quando comparados aos não-estimulados. Baseado no fato de os roedores terem desenvolvido uma aversão natural a espaços abertos (Montgomery, 1958), o buraco central do equipamento de teste é consideravelmente mais aversivo que os laterais, conforme já mencionado anteriormente no presente trabalho.

Diferentemente do que tem sido relatado em outros estudos utilizados para investigar a ansiedade em animais desnutridos (Almeida *et al.*, 1996) o tipo de dieta não influenciou significativamente na exploração do furo central. Isso pode ser devido ao fato de que embora o furo central da tábua de buracos de 5 furos tenha um componente aversivo, o componente de exploração também esteja presente, em maior grau do que em um teste de labirinto em cruz elevado (LCE) (Pellow *et al.*, 1985).

A estimulação aumentou a frequência das visitas aos buracos da caixa na T4, tanto entre os controles como entre os desnutridos, evidenciando que a estimulação foi capaz de

melhorar o desempenho dos animais neste teste. O grupo DN apresentou frequência menor de visitas aos buracos da caixa do que os demais grupos, o que indica que os prejuízos da desnutrição podem ser agravados na falta de uma estimulação adequada. Newport *et al.* (2002) relatam que animais que receberam estimulação, quando filhotes, apresentam maior atividade exploratória quando colocados em um ambiente novo.

A análise minuto a minuto das áreas laterais de ambas as tábuas de buracos (T4 e T5) mostrou que na T5 a frequência das visitas começa a diminuir a partir do 4º minuto de teste e no 5º minuto ela é significativamente menor do que no início do teste (1º minuto). Nas visitas realizadas aos buracos da T4, as frequências das mesmas foi significativamente menor no 5º minuto do que nos demais (exceto no 3º minuto). Essas análises feitas minuto a minuto mostram que em ambas as tábuas houve uma habituação ao teste.

Além dos dados obtidos nos testes realizados na T4 e T5, outros efeitos da desnutrição foram observados nos ratos durante o período em que eles foram mantidos no biotério, principalmente após o período da lactação (dos 21 aos 35 dias de vida). Os animais desnutridos apresentaram pelagem mais esparsa e opaca, sendo possível visualizar regiões do corpo com ausência anormal de pêlo. Além disso, esses animais mostraram-se mais irritadiços do que os animais controles. Quando a grade da gaiola era removida para que o animal fosse manipulado, ele evitava o contato com o manipulador e iniciava comportamentos de saltar na gaiola. Esses mesmos dados foram também documentados por Yu *et al.* (1974).

5.3. Dados bioquímicos

Corticosterona plasmática

Embora esteja documentado na literatura um aumento nos níveis de corticosterona plasmática em consequência da privação alimentar (Devenport, 1992), evidenciando seu

efeito estressante, não foram observadas diferenças significativas na concentração da corticosterona no plasma sanguíneo de animais tratados com uma dieta pobre em proteína. Essa ausência de diferenças pode ser devido a outras variáveis presentes no período em que os animais estavam alojados no biotério, tais como possíveis variações de temperatura ao longo de um dia, presença de outros pesquisadores no biotério, entre outros. Um melhor refinamento das condições de biotério poderia tornar mais evidentes os efeitos da desnutrição nos níveis de corticosterona plasmática, uma vez que em nível comportamental estes foram possíveis de serem observados (a exploração dos furos da tábua de buracos foi maior entre os animais controles do que entre os desnutridos).

Quando se analisam os níveis de corticosterona plasmática entre os estimulados e os não-estimulados podem-se notar menores concentrações desses hormônios entre os animais estimulados. Conforme descrito na literatura (Meaney *et al.*, 1993), animais estimulados podem não apenas apresentar um menor pico de corticosterona após um evento estressante como podem também mostrar uma duração dessa elevação menor. Após 30 minutos da exposição a um evento estressante ocorre um pico de corticosterona no plasma sanguíneo do rato. Atingido esse valor máximo os níveis de corticosterona começam a decair, retornando a valores basais. Animais estimulados apresentam um regresso mais rápido níveis basais de corticosterona plasmática que os não-estimulados (o pico de corticosterona neste caso ocorre antes de decorridos 30 minutos de exposição ao evento estressante). Trata-se de uma resposta fisiológica mais eficiente (mecanismo de feedback negativo) presente entre os animais estimulados, quando comparados com os animais não-estimulados. Em outras palavras, isso evidencia uma maior sensibilidade aos efeitos do feedback negativo, resultante da ação de glicocorticóides sobre o eixo HPA (Newport *et al.*, 2002), de maneira semelhante ao que acontece durante o período hipo-responsivo (Schmidt *et al.*, 2005).

Além disso, observa-se que mães cujos filhotes receberam estimulação aumentam a frequência do comportamento de lambar o filhote (Newport *et al.*, 2002, Francis *et al.*, 1999). De acordo com Levine (2000), o comportamento de lambar a prole no sentido anogenital exerce controle inibitório sobre a secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e o aleitamento mantém as concentrações de corticosterona em valores reduzidos (Meaney *et al.*, 1993; Levine, 2000).

Na análise do fator teste o fato de os animais testados apresentarem, de modo geral, níveis mais elevados de corticosterona que os não-testados indica que o teste da tábua de buracos (4 e 5 furos), embora não envolva fatores reconhecidamente estressantes como altura, temperaturas extremas, choque nas patas, entre outros (Newport *et al.*, 2002); pode ser um evento suficientemente estressante para elevar a concentração de corticosterona no plasma sanguíneo dos animais (estresse leve). Vale ressaltar que o caráter ansiogênico do teste relaciona-se principalmente com um estresse agudo (visto que os animais são expostos uma única vez ao teste, no 36º dia de vida); diferentemente do estresse causado pela desnutrição, que é crônico. Dessa forma o componente estressor relacionado ao teste (estresse agudo) pôde ser detectado pelas medidas de corticosterona plasmática, o que não ocorreu com o estresse nutricional (crônico).

Animais não-estimulados testados apresentaram maiores níveis de corticosterona circulante que os demais animais. Isso pode estar relacionado com uma resposta ao estresse (“coping”) menos eficiente entre os animais não-estimulados quando comparado aos estimulados. Animais não estimulados, além de apresentarem picos de corticosterona circulante mais elevados retornam a níveis basais de corticosterona mais lentamente após exposição a um evento estressante (Meaney *et al.*, 1993), neste caso, o teste na tábua de buracos.

Poliaminas cerebrais

Uma grande variedade de processo intracelulares relacionados com a proliferação e a diferenciação celular requer concentrações de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina). Dessa forma, as concentrações de poliaminas e a atividade da ODC (primeiro passo na síntese de espermidina e espermina a partir da putrescina) são fortemente reguladas (Hixson *et al.*, 1994).

Uma vez que as poliaminas participam do controle do ciclo celular, para que taxas de apoptose e de proliferação celular estejam em equilíbrio, é necessário que concentrações dessas poliaminas esteja sempre dentro de certos parâmetros (Tabor e Tabor, 1976). Os níveis de poliaminas dentro das células estão submetidos a um fino controle que leva em conta necessidades fisiológicas celulares e mecanismos de síntese e degradação de poliaminas, além de captação de poliaminas do meio extracelular (Larson, 2002). A captação e a liberação reguladas de poliaminas juntamente com mecanismos de interconversão das mesmas são elementos presentes no controle da homeostase da maioria das células (Seiler, 1997).

Dentre as poliaminas analisadas (putrescina, espermidina e espermina) tanto no hipocampo como no estriado, foram encontradas diferenças significativas apenas na razão espermidina/espermina nas células do estriado, influenciada pelo fator teste. Como a medida dessa taxa varia muito menos do que medidas de concentrações de cada uma das poliaminas, Hixson *et al.* (1994) assumem que essa medida seja menos afetada por erros de ordem procedimental, sendo um indicador mais confiável na análise dos níveis de poliaminas teciduais.

É sabido que as concentrações de putrescina estão elevadas em condições de estresse, já que grande parte da putrescina é proveniente do catabolismo da espermidina (Seiler, 2000), o que não foi verificado nesse trabalho.

O papel protetor das poliaminas contra a ação potencialmente destrutiva de oxidantes está mais fortemente relacionado com poliaminas de elevado peso molecular, como a espermidina (SPD) e a espermina (SPM). Dados de literatura mostram que apesar de todos os mecanismos acima citados envolvidos no controle das concentrações de poliaminas, parece que o acúmulo de SPD e SPM está sob influência apenas da atividade da ODC (Kuznetsov, 2006), cuja atividade pode ser induzida pela corticosterona (Cousin, 1982).

O presente trabalho mostrou que, de maneira geral, animais testados apresentam maiores níveis de corticosterona em relação aos não testados, o que elevaria as concentrações, gerando acúmulo de SPD e SPM nos animais testados devido à indução da ODC pela corticosterona, mantendo a taxa SPD/SPM em torno de 1, conforme pôde ser verificado no estriado dos animais testados. Já entre os não testados, a razão SPD/SPM se aproxima de 2, indicando um desequilíbrio entre as concentrações dessas duas poliaminas.

Na interação entre os fatores estimulação e teste, animais estimulados que foram submetidos ao teste (ET) apresentaram a razão SPD/SPM próximas de 1 (1,22), enquanto que nos animais não submetidos ao teste, sejam eles estimulados (ES) ou não (NS) essa taxa aproximou-se de 2 (1,95 e 1,79 respectivamente). Tal desequilíbrio não se verifica nas células do hipocampo, provavelmente devido ao fato de que nessa estrutura o “coping” das concentrações de poliaminas seja mais eficiente do que no estriado.

Nota-se que o componente estressor do teste, ao elevar os níveis de corticosterona, induz a atividade da ODC promovendo o acúmulo de SPD e SPM, mantendo essa razão em torno de 1, especialmente nos animais estimulados, o que indica um melhor “coping”.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Na tentativa de se correlacionar parâmetros comportamentais e bioquímicos na análise das conseqüências da desnutrição e da estimulação ambiental, foram feitas análises da atividade exploratória (tábua de buracos com 4 e 5 furos), da ansiedade (tábua com 5 furos) e das concentrações de corticosterona plasmática e poliaminas no hipocampo e no estriado.

As relações entre os parâmetros comportamentais e bioquímicos foram mais claros em relação á corticosterona plasmática do que em relação às poliaminas.

Dados comportamentais referentes ao indicador de ansiedade (furo central da tábua de buracos) mostraram que animais estimulados foram menos ansiosos, uma vez que visitaram mais o furo central. A análise da corticosterona plasmática aponta nessa mesma direção (estimulados apresentaram níveis mais baixos de corticosterona no plasma sanguíneo que os não-estimulados).

Além disso, efeitos de dieta encontrados na atividade exploratória dos animais (controles explorando mais do que os desnutridos) não puderam ser corroborados pela análise da corticosterona plasmática, já que animais desnutridos apresentaram menor atividade exploratória, porém não houve diferenças significativas nos níveis de corticosterona plasmática entre desnutridos e controles. Um refinamento das condições de biotério poderia evidenciar o efeito da dieta sobre os mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse.

Já no que diz respeito às poliaminas, uma melhor delimitação das estruturas analisadas (regiões específicas do hipocampo, como CA1, por exemplo) pode revelar diferenças significativas entre desnutridos e controles, estimulados ou não, testados ou não, facilitando a busca por correlações com parâmetros comportamentais.

Finalmente, além de maior controle sob as condições de biotério, uma combinação de testes (tábua de buracos e labirinto em cruz elevado, por exemplo) poderia auxiliar a separar os efeitos da desnutrição daqueles da estimulação, em nível comportamental, facilitando também uma possível correlação com parâmetros bioquímicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alamy. M.; Mohammed E; Taghzouti, K.; Saddiki-Traki, F.; Bengelloun, WA. Effects of postweaning undernutrition on exploratory behavior, memory and sensory reactivity in rats: Implication of dopaminergic system. **Physiology & Behavior**, v. 86, p. 195-202, 2005.

Almeida, SS; Soares, EG; Bichuette, M; Graeff, FG; De Oliveira, LM. Effects of early postnatal malnutrition and chlordiazepoxide on experimental aversive situations. **Physiology and Behavior**, v. 51, p. 1195 – 1199, 1992.

Almeida, A, Tonkiss, SS; Galler, JR. Prenatal protein malnutrition affects avoidance but not escape behavior in the elevated T – maze test. **Physiology and Behavior**, v. 60, p. 191 – 195, 1996.

Barnes, R. H. Dual role of environmental deprivation and malnutrition in retarding intellectual development. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.29, p. 912-917, 1976.

Barret, DE; Frank DA. The Effects of undernutrition on children's behavior. **Food and Nutrition in History and Anthropology**, v. 6, p. 107 – 193, 1987.

Celédon, JM; Santander, M; Colombo, M. Long-term effects of early undernutrition and environmental stimulation on learning performance of adult rats. **The Journal of Nutrition**, v. 109 (11), p. 1880 – 1886, 1979.

Cousin, M. A.; Lando, D.; Moguilewsky, M. Ornithine decarboxylase induction by glucocorticoids in brain and liver of adrenalectomized rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 38, 1296 – 1304, 1982.

DeCampos, PR. **Estudo das interações entre desnutrição e estimulação ambiental sobre o comportamento do rato**. Monografia apresentada junto ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, p. 29-33, 2006.

Devenport, L.; Stith, R. Mimicking corticosterone's daily rhythm with specific receptor agonists: Effects on food, water, and sodium intake. **Physiology & Behavior**, v. 51, p. 1247 – 1255, 1992.

Dobbing, J. Effects of experimental undernutrition on the development of the nervous system. In: Scrimshaw, NS; Gordom, JE. (Eds.): **Malnutrition, Learning and Behavior**. The M.I.T Press, Cambridge, 1968.

Elias, L. L. K.; Antunes-Rodrigues, J.; Elias, P. C. L.; Moreira, A. C. Effects of plasma osmolality on pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide changes in central diabetes insipidus. **Journal of Clinical Endocrinology e Metabolism**, v. 82 (4), p. 1243 – 1247, 1997.

FAO, 2001 *apud* Feliciano, 2002.

FAO, 2005. www.fao.org

Feliciano, EAO. **Medidas de Aprendizagem de discriminações complexas em ratos controles e desnutridos com apresentação de estímulos sobrepostos no procedimento de comparação com o modelo**, Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, p. 1-25, 2002.

Field, TM. Massage therapy effects. **American Psychological Association** v. 53, p. 1270-1281, 1998.

File, SE; Wardell, A. G. The reability of the hole board apparatus. **Psycopharmacology**, v. 44 (1), p. 47 – 51. 1975.

Francis, D. D.; Meaney, M. J. Maternal Care and the development of stress response. **Current opinion in neurobiology**, v. 9, p. 128 – 134, 1999.

Fraňková, S. The relationship between nutritional and psychological factors development of spontaneous behavior in the rat. In: SRIMSHAW, N.S.; GORDON, J.E. (Eds.). **Malnutrition Learning and Behavior**, N.I.T. Press, Cambridge, p. 312-322, 1968.

Grantham-McGregor, S. A review of studies of the effect of servere malnutrition on mental development. **The Journal of Nutrition**, v. 125 , p. 2233 – 2238, 1995.

Hixson, L. J., Emerson, S. S., Shassetz, R., Gerner, E. W. Source of variability in estimating ornithine decarboxylase activity and polyamine contents in human colorectal mucosa. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 3, p. 317-323, 1994.

Kofman, O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. **Neuroscience Biobehavioural Reviews**, v. 26, p. 457 – 470, 2002.

Kuznetsov, V. I.; Radyukina, N. L.; Shevyakiva, N. I. Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 53 (5), p. 583 – 604, 2006.

Larson, F.; Winblad, B.; Mohammed, A. H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 193 – 207, 2002.

Levine, S. Infantile experience and resistance to physiological stress. **Science**, v. 126, p. 405, 1957.

Levine, S. Influence of Psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, p. 149 – 160, 2000.

Levitsky, DA; Barnes, RH. Nutritional and environmental interactions in the behavioral development of the rat: Long-term effects. **Science**, v.176, p. 68-71, 1972.

Lieberman, HR.; Yeghiayan, SK.; Maher, TJ. A low-protein diet alters rat behaviour and neurotransmission in normothermic and hypertermic environments. **Brain Research Bulletin**, v. 66, p. 149-154, 2005.

Löser C., Wunderlich U., Fölsch UR. Reversed-phase liquid chromatographic separation and simultaneous fluorimetric detection of polyamines and their monoacetyl derivatives in human and animal urine, serum and tissue samples: an improved, rapid and sensitive method for routine application. **Journal of Chromatography**; v. 430, p. 249-262, 1988.

Lukoyanov, NV.; Andrade, JP. 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.

Meaney, M. J.; Bhatnagar, S.; Larocque, S.; McCormick, C.; Shanks, N.; Sharma, S.; Smythe, J.; Viau, V; Plotsky, P. M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 697, p. 70-85, 1993.

Morgane, PJ.; Austin Lafrance, RJ.; Bronzino, JD.; Tonkiss, J.; GallerR, JR. Malnutrition and developing central nervous system. Isacson, R. L.; Jensen, K. F. (ed.). In: **The vulnerable brain and environmental risks**, v. 1, p. 3 – 44, 1992.

Morgane, PJ.; Austin Lafrance, RJ.; Bronzino, JD.; Tonkiss, J.; Diaz-Cintra, S.; Cintra, L.; Kemper, T.; Galler, J. R. Prenatal nutrition and development of the brain. **Neuroscience Behavioral Reviews**, v.17, p. 91-128, 1993.

Morgane, PJ.; Mokler, DJ.; Galler, JR. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 471-483, 2002.

Montgomery, K. C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, p. 254 – 260, 1955 *apud Santucci et al.*, 1994.

Newport, D. J.; Stowe, Z. N.; Nemeroff, C. B. Parental depression: animal models of adverse life event. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, p. 1265 – 1283, 2002.

Pellow, S.; Chopin, P.; Tonkiss, J; Galler J. R. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14(3), p. 149-167, 1985.

Pereira da Silva, SM., De Olivera, LM. Desnutrição e níveis de aminas biogênicas no sistema nervoso central. **Nutrire**, v. 29, p. 75 – 97. 2005.

Reeves, PG.; Nielsen, F. H.; Fahey Jr., G. C. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: final report of American Institute of Nutrition and hoc committee on the reformulation of the AIN-76a rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, p. 1939-1951, 1993.

Riul, T.R.; Carvalho, A.F.; Almeida., S.S.; De Oliveira, L.M.. Effects of different levels of protein and environmental stimulation on the behavior of young rats tested in the elevated plus-maze. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, p. 295–303, 1998.

Rocinho, L. F.; Almeida, SS; De Oliveira, LM. Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 407 – 413, 1997.

Santucci, LB.; Daud, MM.; Almeida, SS.; De Oliveira, LM. Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to the diazepam in two animal models of anxiety. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 49, p. 393 – 398, 1994.

Sapolsky, RM., Meaney, MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Research Reviews**; v. 11, p. 65-76, 1986.

Seiler, N.; Douaud, F.; Havouis, R.; Le Roch, N.; Renault, J.; Vaultier, N.; Moulinoux, J. P.; Dimethylsilane polyamines, a new class of potential anticancer drugs : effects on the growth of lewis lung carcinoma in mice. **International journal of oncology**, v. 11 (4), p. 835 – 841, 1997.

Seiler, N. Oxidation of polyamines and brain injury. **Neurochemical Research**, v. 25 (4), p. 471 – 490, 2000.

Schimdt, M.; Levine, S.; Oitzl, M. S.; van der Mark, M.; Müller, M. B.; Holsboer, F.; Kloet, E.R. Glucocorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during the stress hyporesponsive period of the mouse. **Endocrinology**, v. 146 (3), p. 1458 – 1464, 2005.

Shamberg , SM.; Field, TM. Sensory deprivation Stress and supplemental stimulation in the rat pup and preterm human neonate. **Child Development**. v. 58, p. 1431-1447, 1987

Shrijver, NCA., Bahr, NI., Weiss, IC., Würbel, H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 73, p. 209 – 224, 2002.

Strupp, BJ.; Levitisky, DA. Enduring effects of early malnutrition: A theoretical reappraisal.

The Journal of Nutrition, v. 125, p. 2221 – 2232, 1995

Tabor, CW.; Tabor, H. 1,4-diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine. **Annual Reviews**, v. 45, p. 285-306, 1976.

Tabor, CW.; Tabor, H. Polyamines. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 53, p. 749-790, 1984.

Wallace H. M. The physiological role of the polyamines. **European Journal of Clinical Investigation**; v. 30, p.1-3, 2000.

Williams, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemistry Journal**, v. 325, p. 289-297, 1997.

Williams, K.; McAnulty, P. A. Foetal and placental ornithine decarboxylase activity in the rat — effect of maternal undernutrition. **Journal of Embriology Experimental Morphology**, v. 35 (3), p. 545 559, 1976.

Yu, M.C.; Lee, J. C.; Bakay, L. The ultrastructure of the rat central nervous sytem in chronic undernutrition. **Acta Neuropathology**, v. 30, p. 197-210, 1974.

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](#)