



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Juliana de Oliveira Silva

Análise comportamental de ratos Wistar machos em diferentes idades em um modelo de programação metabólica pela restrição protéica materna durante a lactação

Rio de Janeiro
2013

Juliana de Oliveira Silva

Análise comportamental de ratos Wistar machos em diferentes idades em um modelo de programação metabólica pela restrição protéica materna durante a lactação

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Coorientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S586 Silva, Juliana de Oliveira.
Análise comportamental de ratos Wistar machos em diferentes idades em um modelo de programação metabólica pela restrição protéica materna durante a lactação / Juliana de Oliveira Silva – 2013.
86 f.

Orientador: Alex Christian Manhães.

Coorientadora: Patrícia Cristina Lisbôa da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Desnutrição proteico-energética - Teses. 2. Rato como animal de laboratório - Metabolismo - Teses. 3. Rato como animal de laboratório - Comportamento - Teses. 4. Lactação – Teses. 5. Ratos Wistar. I. Manhães, Alex Christian. II. Silva, Patrícia Cristina Lisbôa da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 577.121:599.323.4

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Juliana de Oliveira Silva

Análise comportamental de ratos Wistar machos em diferentes idades em um modelo de programação metabólica pela restrição protéica materna durante a lactação

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2013.

Orientador:

Prof. Dr. Alex Christian Manhães
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Regina Célia Cussa Kubrusly
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Jesus Landeira-Fernandez
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2013

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Alex, agradeço pela oportunidade de entrar no laboratório logo no início da graduação, pela orientação, confiança e apoio todos esses anos. Você é um grande exemplo.

À minha coorientadora Patrícia, agradeço todo apoio, paciência e exemplo de dedicação à pesquisa.

A Elaine de Oliveira, pela atenção, paciência e disponibilidade na revisão da dissertação.

À Yael pelo grande exemplo de competência e dedicação à pesquisa, ao Claudio por todas as discussões de seminários, projetos que com certeza contribuíram na minha formação e por fazer dos nossos almoços os mais engraçados possíveis. Ao Anderson por todas as ajudas e dúvidas tiradas.

À Ellen, agradeço a colaboração neste trabalho e a paciência e disponibilidade em nos ensinar as técnicas de avaliações endócrinas.

À Fernanda e Mabel, pela colaboração e ajuda sempre que necessário.

Aos colegas de laboratório, em especial os amigos: Ana Carolina, Ju, Dani, Kélvia, André, Carla, Anna, Fabi, Sylvio, Fê, Cris e Monique, eu agradeço pelo apoio, pelo carinho, pela amizade, pelas zoações, por toda ajuda e compreensão todos esses anos, por estarem sempre presentes quando eu precisei, por deixar os dias mais alegres e felizes e por fazerem com que esse laboratório seja especial pra todos que passam por ele. Eu amo vocês!

Aos amigos da graduação, Anatalia, Flávia, Thiago e Luíza, pela amizade de sempre.

À minha melhor amiga, Laila, pela atenção, pelo cuidado, pelo amor, pela paciência, por segurar minha onda nos momentos em que eu queria surtar, por todos os dias em que ela me mandava estudar, escrever e tinha ainda que me lembrar que eu precisava comer, dormir, descansar. Por estar sempre por perto e me ajudar em absolutamente em qualquer coisa que eu precisasse, por ser a minha “best”. Eu amo muito você!

À minha mãe Lucia e os meus irmãos Lucas e Nathalia pelo apoio e amor, mesmo de longe. Obrigada!

A Deus, de onde vem tudo o que eu tenho, tudo o que sou e tudo que eu vier a ser.

O conhecimento é o processo de acumular dados; a sabedoria reside na sua simplificação.

Martin Luther King

RESUMO

SILVA, Juliana de Oliveira. *Análise comportamental de ratos Wistar machos em diferentes idades em um modelo de programação metabólica pela restrição protéica materna durante a lactação*. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A desnutrição neonatal em ratos resulta em alterações metabólicas e endócrinas nas proles a curto e a longo prazo. Sabe-se que algumas destas alterações, como o conteúdo aumentado de catecolaminas adrenais e a hipercorticosteronemia nos animais adultos estão associadas a alterações comportamentais. Não se sabe, no entanto, se as alterações comportamentais observadas estão presentes desde o insulto original, a desnutrição, ou se estas se desenvolvem ao longo do tempo. Neste sentido, avaliamos em ratos Wistar os efeitos da programação pela restrição protéica materna durante a lactação sobre os parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade, à atividade locomotora e à memória/aprendizado em diferentes idades ao longo do desenvolvimento. Ao nascimento das suas proles as progenitoras foram separadas em: Grupo restrição protéica (RP) - que recebeu ração hipoprotéica (8% de proteína) do nascimento ao desmame [dia pós-natal (P) 21], e Grupo CONT (controle) - que recebeu ração normoprotéica neste período. Os seguintes testes comportamentais foram realizados com a prole (21 animais / grupo / idade) em P21, P45, P90 e P180: 1) labirinto em cruz elevado (LCE) - avalia comportamentos associados à ansiedade; 2) campo aberto (CA) - avalia atividade locomotora; 3) labirinto aquático radial de oito braços (LARO) - avalia memória e aprendizado. Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação, o sangue foi coletado para dosagem da corticosterona sérica e a glândula adrenal para quantificação das catecolaminas adrenais. No LCE, os animais RP apresentaram aumentos significativos nas variáveis associadas à ansiedade quando comparado ao grupo CONT somente em P21. No CA foi observada uma redução significativa no número de retângulos percorridos pelo grupo RP somente na idade de P90. No LARO não identificamos diferenças significativas entre os grupos durante os quatro primeiros dias de teste, independente da idade. No quinto dia de testes (probe trial), o grupo RP mostrou uma diminuição na latência para encontrar a plataforma, em P21 e P180. Quanto à função adrenal, o grupo RP apresentou uma diminuição nos valores de corticosterona sérica em P90, e um aumento no conteúdo de catecolaminas adrenais quando comparado ao grupo CONT em P21 e P180. Nas demais idades analisadas não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Nossos dados indicam que os animais do grupo RP apresentam: 1) redução do comportamento associado à ansiedade no final do período de lactação; 2) redução da atividade locomotora em adultos jovens; 3) melhora do desempenho de memória e aprendizado no final da lactação e na idade adulta (P180). Adicionalmente, os dados indicam que há uma associação entre alterações nos parâmetros comportamentais e da função adrenal. Podemos concluir que a restrição protéica durante o período de lactação em ratos afeta o comportamento apresentado ao longo da vida e que o padrão temporal dos efeitos varia em função do comportamento estudado.

Palavras-chave: Desnutrição. Programação metabólica. Lactação. Comportamento.

ABSTRACT

SILVA, Juliana de Oliveira. *Behavioral analysis of male Wistar rats at different ages in a metabolic programming model by maternal protein restriction during lactation*. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Neonatal undernutrition in rats results in short- and long-term metabolic and endocrine alterations in the offspring. It is known that some of these alterations, such as adrenal catecholamines content and hypercorticosterone, are associated with behavioral alterations in adult animals. However, it is not known whether these are present since the original insult or if these arise at some specific point after it. In this sense, in the present work, we analyzed, in Wistar rats, the effects of protein restriction programming during lactation on behavioral parameters associated with anxiety, locomotor activity and memory learning at different time points during development and maturation. Progenitors were separated into two groups after delivering: PR (protein restriction) group – which received hypoproteic chow (8% protein) from birth to weaning [postnatal day (P) 21], and CONT (control) group – which received normoprotein chow during this period. The following behavioral tests were used to analyze offspring behavior (21 animals per group per age) at P21, P45, P90 and P180: 1) elevated plus maze (EPM) – used to assess anxiety related behaviors; 2) open field (OF) – used to assess locomotor activity; 3) radial arm water maze (RAWM) – used to assess memory and learning. After the behavioral tests, animals were decapitated and blood and the adrenal glands were collected for the analyses of catecholamine content and serum corticosterone level. In the EPM, PR animals had a significant increase in the values of the anxiety-associated variables when compared to the control group at P21. No differences were observed between groups at other time-points. In the OF, a significant reduction in the number of traversed rectangles was observed in the PR group at P90. No differences were observed between groups at other time-points. In the RAWM, we failed to identify significant differences between groups during the first four days of testing in all ages. On the fifth day (probe trial), the PR group had a significant reduction in the latency to find the scape platform at P21 and P180. As for the endocrine data, the PR group had a significant reduction in serum corticosterone level at P90. No differences were observed between groups at other time-points. Catecholamine content was increased in the RP group at P21 and P180. No differences were observed between groups at other time-points. Our data indicate that animals in the PR group display: 1) a reduction in anxiety-like behaviors at weaning; 2) a reduction in locomotor activity as young adults; 3) an improvement in memory/learning performance both at weaning and as mature adults. Additionally, our results indicate that there is an association between behavioral and endocrine alterations. We can conclude that protein restriction during lactation in rats affects behavior at different time points during the animal's life and that the temporal profile of the effects varies as a function of the behavior that is being assessed.

Keywords: Undernutrition. Metabolic programming. Lactation. Behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Ingredientes utilizados no preparo da ração artesanal.....	28
Quadro 2 -	Modo de preparo e composição das rações utilizadas.....	28
Figura 1 -	Fotografia do labirinto em cruz elevado.....	31
Figura 2 -	Fotografia do campo aberto.....	32
Figura 3 -	Fotografia do labirinto aquático radial de 8 braços.....	34
Figura 4 -	Evolução da massa corporal das progenitoras.....	39
Figura 5 -	Evolução da massa corporal das proles.....	40
Figura 6 -	Evolução da massa corporal após a lactação.....	41
Figura 7 -	Evolução da quantidade de ração ingerida (valores absolutos).	42
Figura 8 -	Evolução da quantidade de ração ingerida (valores relativos)...	42
Figura 9 -	Tempo no braço aberto (A) e percentual de tempo no braço aberto (B) no LCE, segmentados por grupo e idade.....	44
Figura 10 -	Entradas no braço aberto (A) e percentual de entradas no braço aberto (B) no LCE, segmentados por grupo e idade.....	45
Figura 11 -	Entradas no braço fechado no LCE, segmentado por grupo e idade.....	46
Figura 12 -	Percentual de tempo no centro no LCE, segmentado por grupo e idade.....	46
Figura 13 -	Número de alongamentos no LCE, segmentado por grupo e idade.....	47
Figura 14 -	Número de eventos de atividade vertical no LCE, segmentado por grupo e idade.....	47
Figura 15 -	Número de eventos de avaliação de risco no LCE, segmentado por grupo e idade.....	48
Figura 16 -	Número de eventos de auto-limpeza no LCE, segmentado por grupo e idade.....	48
Figura 17 -	Número de eventos de retorno para o braço fechado no LCE, segmentado por grupo e idade.....	49
Figura 18 -	Números de entradas totais no CA, segmentado por grupo e idade.....	50
Figura 19 -	Tempo no centro no CA, segmentado por grupo e idade.....	51

Figura 20 - Entradas no centro (A) e percentual de entradas no centro (B) no CA, segmentados por grupo e idade.....	52
Figura 21 - Números de eventos de atividade vertical no CA, segmentado por grupo e idade.....	53
Figura 22 - Números de eventos de auto-limpeza no CA, segmentado por grupo e idade.....	53
Figura 23 - Latência para encontrar a plataforma do LAROB na idade de PN21, segmentado por grupo.....	54
Figura 24 - Latência para encontrar a plataforma do LAROB na idade de PN45, segmentado por grupo.....	55
Figura 25 - Latência para encontrar a plataforma do LAROB na idade de PN90, segmentado por grupo.....	55
Figura 26 - Latência para encontrar a plataforma do LAROB na idade de PN180, segmentado por grupo.....	56
Figura 27 - Latência para encontrar a plataforma do LAROB no probe trial, segmentados por grupo e idade.....	56
Figura 28 - Conteúdo de corticosterona sérica, segmentados por grupo e idade.....	57
Figura 29 - Conteúdo de catecolaminas totais, segmentados por grupo e idade.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA _r	Análise de variância com medidas repetidas
BA	Braço aberto
BF	Braço fechado
CA	Campo aberto
CN	Área central
CONT	Grupo controle
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
K-S	Kolmogorov-Smirnov
LAROB	Labirinto aquático radial de Oito braços
LCE	Labirinto em cruz elevado
LEP	Leptina
LFE	Laboratório de Fisiologia Endócrina
LN	Laboratório de Neurofisiologia
OMS	Organização mundial da saúde
OPAS	Organização Pan-americana da saúde
POF	Pesquisa de orçamentos familiares
PRL	Prolactina
RIE	Radioimunoensaio
RP	Restrição protéica
SAS	Sistema simpatoadrenal
SNC	Sistema nervoso central
TT	Total

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	26
2	MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1	Animais	27
2.2	Instalação da malnutrição protéica	27
2.3	Consumo de ração, massa corporal e desenvolvimento somático ..	29
2.4	Testes comportamentais	29
2.4.1	<u>Labirinto em cruz elevado</u>	29
2.4.2	<u>Campo aberto</u>	31
2.4.3	<u>Labirinto aquático radial de oito braços</u>	33
2.5	Avaliação da função adrenal	34
2.5.1	<u>Corticosterona</u>	35
2.5.2	<u>Catecolaminas</u>	35
2.6	Estatística	36
2.6.1	<u>Aspectos preliminares</u>	36
2.6.2	<u>Massa corporal e ingestão de ração</u>	36
2.6.3	<u>Parâmetros comportamentais</u>	37
2.6.4	<u>Parâmetros endócrinos</u>	37
2.6.5	<u>Aspectos complementares</u>	37
3	RESULTADOS	39
3.1	Massa corporal e ingestão de ração	39
3.1.1	<u>Massa corporal das progenitoras</u>	39
3.1.2	<u>Massa corporal das proles</u>	40
3.1.3	<u>Ingestão de ração</u>	41
3.2	Testes comportamentais	43
3.2.1	<u>Teste do labirinto em cruz elevado</u>	43
3.2.2	<u>Teste do campo aberto</u>	49
3.2.3	<u>Teste do labirinto aquático de 8 braços</u>	54
3.3	Avaliação da função adrenal	57
3.3.1	<u>Corticosterona sérica</u>	57

3.3.2	<u>Conteúdo de catecolaminas</u>	58
4	DISCUSSÃO	59
4.1	Massa corporal e consumo de ração	61
4.2	Comportamento e função adrenal	62
4.2.1	<u>21º dia pós-natal (P21)</u>	62
4.2.2	<u>45º dia pós-natal (P45)</u>	66
4.2.3	<u>90º dia pós-natal (P90)</u>	67
4.2.4	<u>180º dia pós-natal (P180)</u>	68
4.3	Considerações finais	69
5	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73

INTRODUÇÃO

Programação metabólica ou plasticidade ontogenética

Durante a gestação e lactação, o organismo encontra-se em intenso crescimento, apresentando intensa replicação e diferenciação celular, o que torna esta fase do desenvolvimento mais sensível a alterações, sendo considerados, portanto, períodos de maior sensibilidade. Assim, os períodos em que o organismo encontra-se mais suscetível aos estímulos externos são chamados de “períodos críticos” (Gluckman et al., 2005).

O termo “programação” se refere a uma alteração permanente de uma determinada função, conseqüente a um estímulo ou agressão (*imprinting*) ocorrido em um período crítico da vida (Barker, 1995; Lucas, 1999; Moura e Passos, 2005). Atualmente, o termo "plasticidade ontogenética" tem sido mais utilizado e propõe uma forma menos determinística e mais probabilística para explicar o surgimento de doenças em resposta a insultos durante as fases particularmente vulneráveis da vida de um indivíduo (Gluckman; Hanson, 2007).

Sabe-se que alterações nutricionais, hormonais e ambientais durante estágios críticos do desenvolvimento podem alterar a fisiologia e o metabolismo, provocando o desenvolvimento de distúrbios na vida adulta (Passos et al., 2000; De Moura; Passos, 2005; De Moura et al., 2008; Barker, 1995, 2003, 2004; Walker; Courtin, 1985; Pracyck et al., 1992; Dorner; Plagemann, 1994; Mantzoros et al., 1997; Godfrey; Robinson, 1998). A programação metabólica pode ser considerada uma ferramenta adaptativa utilizada por organismos que vivem em ambientes onde um ou mais fatores considerados essenciais ao desenvolvimento estão alterados, como por exemplo, insuficiência de nutrientes ou em condições estressantes. Esta é uma hipótese bem conhecida, descrita por Barker, que associa baixo peso ao nascer, uma medida indireta da qualidade do ambiente fetal, com a maior prevalência de Síndrome Metabólica (obesidade, hipertensão, resistência à insulina, hipertrigliceridemia e diabetes mellitus tipo 2) na idade adulta, sendo esta conhecida

como a hipótese da “origem fetal” da doença (Barker, 1995, 2007). O baixo peso ao nascer não é a causa de tantos problemas, mas sim o que este fato representa: a desnutrição fetal e/ou os danos ocorridos durante o desenvolvimento. Como o feto depende dos nutrientes vindos da mãe, no caso de desnutrição materna, ele se adapta a esta nutrição inadequada, seja priorizando o crescimento cerebral em detrimento de outros tecidos, como órgãos abdominais, ou alterando a secreção ou sensibilidade a hormônios (Fall, 2009). Do ponto de vista evolutivo, a programação tem como objetivo preparar o metabolismo para a sobrevivência do indivíduo frente a condições adversas no futuro (Hales; Barker, 1992; Simmons, 2005). Entretanto, as alterações adaptativas podem persistir mesmo em condições normais de fornecimento de nutrientes. Neste sentido, a modificação de funções de órgãos e tecidos deixa de ser uma vantagem adaptativa e torna-se deletéria para o organismo.

Desnutrição

A desnutrição, conforme a definição da Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma condição patológica causada por um desequilíbrio e/ou uma deficiência de nutrientes no organismo. Tais desequilíbrios são frequentemente produzidos pela deficiência de proteínas, carboidratos, gorduras e micronutrientes, que cursam com alterações fisiopatológicas que, por sua vez, resultam em prejuízos funcionais e/ou estruturais conforme a Organização Pan-americana da Saúde (OPAS, 2000).

Na infância, uma alimentação adequada é condição fundamental para o seu pleno crescimento e desenvolvimento. O estado nutricional indica em que proporção as necessidades fisiológicas de nutrientes estão sendo supridas para manter a composição e funções adequadas do organismo (Batista Filho; Rissin., 2003; Acuña; Cruz, 2004). Uma deficiência quantitativa e/ou qualitativa do consumo de nutrientes é uma das causas imediatas mais significativas dos problemas de saúde e nutrição (Sigulem et al., 2000).

Dentre os diversos tipos de desnutrição, a protéico-energética é a mais prevalente desordem nutricional e ocorre frequentemente na gestação, lactação e até os 2 anos de vida. Um dos principais efeitos da desnutrição precoce é a alteração de parâmetros antropométricos (peso e estatura), considerados marcadores epidemiológicos de desnutrição (Romani; Lira, 2004). Assim, a desnutrição pode ser classificada, de acordo com o déficit de altura comparado com a idade, sendo considerado um nanismo nutricional (desnutrição crônica), ou de acordo com déficit de peso para idade (desnutrição aguda), que pode ser leve, moderada ou grave (Gurmini et al., 2005).

A desnutrição também predispõe a várias complicações graves de saúde, como tendência à infecção, prejuízo na cicatrização de feridas, falência respiratória, entre outros. Além disso, ela é um dos principais fatores que afetam o desenvolvimento cerebral e diversos estudos têm demonstrado uma correlação entre a desnutrição protéico-calórica e alterações no desenvolvimento cognitivo como: prejuízos na linguagem, nas funções visuo-espaciais, na atenção e no aprendizado (Acunã; Cruz, 2004; Milman et al., 2005; Mansur; Neto, 2006; Victoria et al., 2008; Laus et al., 2011). Estudos com suplementação protéica, como o realizado por Pollitt et al., 1993) na Guatemala, demonstrou que a suplementação protéica durante o início da infância melhora a performance psico-educacional. Outro exemplo é um estudo realizado no México em uma comunidade de baixa renda da área rural onde um grupo de mães foi suplementado com calorias e proteína durante a gestação e a lactação, e ainda, após o nascimento, as crianças receberam leite de vaca, enquanto outro grupo não foi suplementado, seguindo o hábito de alimentação da comunidade. As crianças suplementadas desenvolveram um padrão diferente de interação com o ambiente e com a mãe, essas crianças dormiam menos, se recusavam a ficar no berço e brincavam mais. Após um ano e meio da intervenção, as crianças suplementadas eram mais agitadas, brincalhonas, exigentes e desobedientes do que as não suplementadas (Chávez et al., 1975).

A desnutrição ainda é a desordem nutricional mais prevalente em crianças de países em desenvolvimento. No mundo, 2,6 milhões de crianças menores de cinco anos morrem todo ano por subnutrição (correspondendo a mais de 1/3 das mortes na infância), 170 milhões de crianças sofrem de desnutrição crônica e uma em cada

três crianças de países em desenvolvimento sofre de nanismo (Save The Children, 2012). Mas apesar de ser ainda frequente no mundo, estudos mostram uma tendência de mudança no panorama de sua prevalência. Estima-se que entre os anos de 1990 e 2015 a prevalência mundial da desnutrição tenderá a diminuir de 26,5% para 17,6%. Nos países desenvolvidos esta redução deverá ser de 1,6% para 0,9%; e de 30,2% para 19,3% nos países em desenvolvimento. Com destaque para a redução de 47% da prevalência da desnutrição na Ásia e de 61% na América Latina. Entretanto, acredita-se que em algumas regiões da África, a prevalência de desnutrição aumente de 24% para 26,8%, mostrando que as alterações do panorama da desnutrição mundial não seguem o mesmo padrão (De Onis et al., 2004).

Apesar da pequena redução da desnutrição mundial nos últimos 30 anos, o Brasil registrou grandes avanços neste tema, tanto no que se refere à redução dos óbitos, como da prevalência de desnutrição na infância. Entre 1979 e 2009, os óbitos por desnutrição reduziram 95%. Em 1979, as mortes de crianças por desnutrição representavam quase 5% dos óbitos na infância no país; em 1989, o percentual caiu para 3%; entre 1996 e 2002 para 2%; em 2006 para 1,3% e, finalmente, em 2009 representavam apenas 1% do total dos óbitos de crianças menores de 5 anos. Cabe ainda ressaltar que as regiões Norte e Nordeste concentraram 70% dos óbitos em 2009.

A despeito dos grandes avanços no âmbito nacional, é essencial compreender que o problema não foi erradicado no país. Embora em comparação com os parâmetros internacionais os percentuais do país sejam poucos expressivos, em 2011 o Brasil ainda possuía 32 mil crianças menores de cinco anos em desnutrição grave (baixo peso para a idade) e mais de 159 mil crianças desta faixa sofrendo de desnutrição crônica (altura muito baixa para a idade). Assim como no caso dos óbitos, a prevalência da desnutrição permanece sendo alta nas regiões Norte e Nordeste, que historicamente concentram os piores indicadores de condições de vida do país. De fato, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) realizada em 2008-2009 evidenciou a maior presença de desnutrição nas famílias de menor renda. Se nas famílias com renda per capita até $\frac{1}{4}$ de salário mínimo foi constatado déficit altura-idade de 8,2%, este percentual caiu para 3,1% das crianças menores

de cinco anos em famílias cujo rendimento per capita superava cinco salários mínimos. Por outro lado, esta pesquisa não mostrou variação significativa entre a área rural e urbana (Thomazinho et al., 2012).

Sistema nervoso durante o desenvolvimento e desnutrição

Durante a década de 60, um grupo de pesquisadores constatou que, naquela época, metade das crianças do mundo sofria de diferentes graus de desnutrição e que esta condição poderia afetar permanentemente suas funções intelectuais (Scrimshaw, 1968). A desnutrição durante os períodos iniciais da vida não só reduz o crescimento cerebral, como também deixa o cérebro permanentemente em menor tamanho, sendo estas observações também feitas em ratos (Smart et al., 1973), camundongos (Randt; Derby, 1973), porquinhos-da-índia (Chase et al., 1971) e porcos (Dickerson; Dobbing, 1966). De fato, modelos experimentais têm sido amplamente utilizados em estudos dos efeitos de curto e longo prazo de diversos tipos de desnutrição em diferentes fases da vida.

Estudos em ratos indicam que o período pós-natal é suscetível aos efeitos deletérios da desnutrição na função cerebral, uma vez que o cérebro tem um rápido crescimento durante esse período (Dobbing, 1964; Winick; Noble, 1966). Este período de crescimento acelerado é conhecido como “surto de crescimento cerebral” (*brain growth spurt* no original em inglês) (Dobbing; Sands, 1979). Em humanos, o surto de crescimento cerebral começa no início do terceiro trimestre de gestação e tem seu pico por volta do nascimento. Em ratos e camundongos, este período se inicia no dia do nascimento e tem seu pico por volta do décimo dia pós natal (Bandeira et al., 2009; Dobbing; Sands, 1979). Por isso, vários autores têm considerado que, em ratos e camundongos, os primeiros 10 dias de vida pós-natal correspondem, do ponto de vista do desenvolvimento neural, ao período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana (Dobbing; Sands, 1979; Nunes-Freitas et al., 2011).

O período do surto de crescimento cerebral é crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso. Pois é durante este período que ocorrem os picos de uma série de processos fundamentais para a formação da circuitaria neural como a neurogênese (no hipocampo e cerebelo), a migração de populações neuronais, a morte celular programada, o crescimento axonal e dendrítico, e a sinaptogênese em diversas regiões cerebrais (Goodlett et al., 2005; Goodlett; Horn, 2001). Desta forma, qualquer perturbação durante este período pode comprometer de modo significativo a formação das futuras redes neurais e, portanto, acarretar em prejuízos geralmente irreversíveis para a vida do indivíduo.

Considerando o rápido crescimento do cérebro neste período, fica claro que está associado a demandas nutricionais significativas. Desta forma, uma dieta inadequada durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) pode comprometer tanto a estrutura quanto a função cerebral (Benton et al., 2008), resultando em mudanças de longa duração na formação e função dos circuitos cerebrais (Charney; Bremner, 1999; Stanwood; Levitt, 2004; Bhatnaga et al., 2005) e aumentando o risco de déficits cognitivos na idade adulta (Strupp; Levitsky, 1995; Charney; Bremner, 1999). De fato, crianças desnutridas apresentam profundas mudanças no desenvolvimento cerebral (Wang; Brand-Miller, 2003), como desordem na diferenciação de células nervosas, diminuição no número de sinapses e conteúdo de neurotransmissores, atraso na mielinização e redução do desenvolvimento global da arborização dendrítica. Adicionalmente, estudos epidemiológicos descrevem uma associação entre períodos de restrição alimentar durante a gestação e alterações neurológicas como esquizofrenia (Susser et al., 1996; St Clair et al., 2005) desordens do humor (Brown et al., 2000) e alterações de personalidade na vida adulta (Neugebauer et al., 1999).

Estudos em animais mostram que a desnutrição no começo da vida também afeta sua estrutura cerebral (Randt; Derby, 1973; Warren; Bedi, 1988; Morgane et al., 1993), resultando por exemplo na redução do total número de células (Jahnke; Bedi, 2007). Este achado pode ser devido a uma falha na geração do número normal de neurônios e células da glia durante o período da neurogênese e glicogênese e/ou poderia ser devido à morte celular não programada resultante da falta de nutrientes disponíveis (Jahnke; Bedi, 2007). Cabe mencionar que o processo

apoptótico é altamente sensível ao status nutricional do animal (Ciaroni et al., 2002; Ferri et al., 2003; Jahnke; Bedi, 2007).

Particularmente a desnutrição por carência na ingestão de proteínas é capaz de causar alterações no desenvolvimento do SNC (Debassio, 1996, 1994), modificando a morfologia das células do hipocampo (Díaz-Cintra et al., 1991), bem como no número e distribuição dos receptores de neurotransmissores (Almeida et al., 1996). Além disso, a restrição de proteína afeta a neurotransmissão catecolaminérgica, serotoninérgica (Wiggins et al., 1984), glutamatérgico (Rotta et al., 2003) e gabaérgica (Steiger et al., 2003, 2002), demonstrando que, além da fase da vida em que ocorre a desnutrição, o tipo da carência nutricional também pode influenciar nos desfechos no que diz respeito ao desenvolvimento neural.

Modelos animais de programação por desnutrição durante a lactação

Apesar da existência de diversos dados epidemiológicos e clínicos sobre os efeitos da desnutrição, modelos experimentais têm sido extensamente desenvolvidos para um melhor entendimento dos mecanismos bioquímicos, fisiológicos, morfológicos e moleculares envolvidos no processo da desnutrição bem como dos seus impactos a curto e longo prazo. Os modelos de desnutrição protéica ou protéico-calórica são os mais comuns em estudos com animais (Laus et al., 2011). Vale ressaltar que a grande utilização de roedores se dá devido ao seu curto ciclo de vida e, em relação a outras espécies, estes animais apresentam o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) bem semelhante ao dos seres humanos.

A desnutrição pré- e pós-natal em ratos aumenta a motivação por comida e água devido à privação imposta anteriormente (Brioni et al., 1988; Tonkiss et al., 1994), reduz a flexibilidade cognitiva (Smart, 1993; Strupp et al., 1995) e causa danos no processo de aprendizado e memória (Valadares et al., 2010). As mudanças comportamentais descritas são decorrentes de alterações morfológicas e funcionais, principalmente no neocórtex e hipocampo (Morgane et al., 1993).

O Laboratório de Fisiologia Endócrina (LFE) tem desenvolvido diversos modelos de programação no período de lactação e, através destes modelos, vêm demonstrando que mudanças nutricionais (Passos et al., 2004; Fagundes et al., 2007), hormonais (Bonomo et al., 2005; Trevenzoli et al., 2007). e ambientais (Oliveira et al., 2009; Santos-Silva et al., 2012) afetam o estado nutricional da prole na vida adulta e seu perfil metabólico e endócrino. Existem vários métodos de induzir a desnutrição e estudar os seus efeitos, tais como dietas pobres em proteínas, calorias, grandes ninhadas, remoção das crias das progenitoras (mantidas durante o dia com uma fêmea não-lactante ou em uma incubadora) e cauterização de alguns dos mamilos materno impedindo o acesso dos filhotes ao leite materno (Crnic, 1980).

Entre as diferentes formas de desnutrição estudadas ao longo dos anos, a restrição protéica (RP) tem se destacado devido ao fato de que a proteína é um dos nutrientes mais importantes, contendo aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas estruturais, enzimas, neuropeptídeos e neurotransmissores (Valadares et al., 2010). A RP através de dieta hipoprotéica pode ser feita com diferentes graus de restrição. Ramadan (2012) utilizam dieta contendo apenas 5 % de proteína. GAO (2012) e Françolin-Silva (2006) utilizam ração hipoprotéica contendo 6 % de proteína. Reyes-Castro (2012), por sua vez usaram em seu estudo uma dieta com 10% de proteína.

O modelo de RP também tem sido estudado em nosso departamento pelo LFE, onde foram avaliados os efeitos deste tipo de desnutrição na mãe lactante e na sua prole até a idade adulta (P180). Neste modelo é oferecida uma ração contendo 8% de proteína em relação à ração padrão (22-23%). As progenitoras recebem esta ração preparada no próprio LFE durante toda a lactação (P1 a P21). Desta forma, os filhotes tornam-se desnutridos em função da menor oferta protéica através do leite materno. Durante a lactação, há diminuição na ingestão alimentar e no peso corporal das progenitoras RP (Passos et al., 2000). Estas fêmeas não apresentam diferença na massa de gordura visceral, o que demonstra que a diminuição do peso corporal pode ser devido à perda de tecido adiposo subcutâneo ou tecido muscular (Lisboa et al., 2006).

Não há diferença nas concentrações séricas de corticosterona nas mães RP, e sendo a RP um evento estressante, é provável que a hiperleptinemia apresentada por essas ratas seja responsável por esta manutenção, uma vez que ela inibe o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Além disso, é possível também que este seja um mecanismo que minimiza o catabolismo de proteínas (Lisboa et al., 2006). Até meados da lactação há diminuição na produção de leite (Passos et al., 2000), que pode ser decorrente da hipoprolactinemia que foi encontrada nas mães RP (Lisboa et al., 2006). Entretanto em relação aos nutrientes do leite materno, não há diferença na concentração de lactose e de lipídeos, porém a concentração de proteínas é menor, assim como o seu valor calórico (Passos et al., 2000).

Em relação aos filhotes RP, durante a lactação há diminuição no ganho de massa corporal destes animais quando comparados ao grupo controle, e mesmo após o desmame, quando passam a receber dieta padrão até P180, a prole RP ainda possui menor massa corporal (Passos et al., 2000). Ao desmame, a prole RP apresenta maior concentração de leptina quando comparada ao grupo controle, isto já era esperado uma vez que as mães RP nesta fase apresentam hiperleptinemia que é transferida para a prole através do leite (Lisboa et al., 2006), já na idade adulta, não há diferença na concentração sérica de leptina. No entanto, a administração aguda e sistêmica de leptina na prole RP adulta não produziu a esperada diminuição na ingestão alimentar, diferente do observado no animal controle que responde a injeção deste hormônio anorexígeno. Isto sugere que haja uma resistência hipotalâmica ao efeito anorexígeno da leptina nos animais programados pela RP. Esta resistência pode ser consequência de uma infra-regulação de seus receptores centrais devido ao alto nível sérico de leptina a que esta prole foi exposta no desmame (Passos et al., 2004). Ainda, foi detectado que a prole RP adulta possui maior expressão de receptores para leptina na pituitária, o que pode representar um maior efeito inibitório da leptina sobre a liberação de TSH (Vicente et al., 2004).

Efeitos da desnutrição sobre o comportamento

As mudanças importantes na sequência temporal da maturação do cérebro, associadas com a desnutrição, podem causar distúrbios nos circuitos neuronais (Udani, 1992), prejudicando permanentemente as funções cognitivas (Scrimshaw, 1968; Levitsky; Strupp, 1995). Por exemplo, a flexibilidade cognitiva, atenção, memória e percepção visual são afetadas pela desnutrição infantil (Kar et al., 2008). Dado o fato de diferentes aspectos da função cognitiva estarem associadas à desnutrição, diferentes áreas cerebrais podem ficar comprometidas em diferentes graus na presença da desnutrição (Kar et al., 2008). Estudos têm mostrado que prejuízos no desempenho de uma variedade de tarefas de aprendizado podem ser atribuídos a alterações na motivação e na emoção em indivíduos desnutridos (Levin et al., 1976; Levitsky; Strupp, 1995; Stone et al., 2005).

O hipocampo é muito sensível ao estresse e a desnutrição pode ser um importante evento estressante. Ciaroni et al., (2002) demonstraram que durante o desenvolvimento do hipocampo, a célula imatura é mais suscetível a apoptose quando há presença de desnutrição. O hipocampo tem um importante papel no processamento da memória normal (Hirsh, 1974; Olton et al., 1978; O'keefe, 1990), atividade locomotora e comportamento de ansiedade (Gray; Mcnaughton, 1996; Bast; Feldon, 2003; Bannerman et al., 2004). Em relação a este último caso, já se demonstrou que a resposta comportamental a drogas ansiolíticas está diminuída em animais desnutridos (Brioni et al., 1988; Almeida et al., 1990, 1991, 1992; Laino et al., 1993).

Estudos também têm apontado para uma associação entre a desnutrição durante o desenvolvimento e uma maior susceptibilidade ao vício tardiamente. Valdomero et al (2006) submeteram ratos a uma restrição protéica (RP) de 8% de proteína a partir do 14º dia de gestação até 40º dia de vida pós-natal (P) e na idade adulta, realizaram o teste de preferência condicionada por lugar com cocaína. O objetivo deste teste é que o animal associe o ambiente com os efeitos de recompensa de uma determinada droga. Assim, após algumas sessões de condicionamento, esta associação é testada. Se após o condicionamento o animal

despender mais tempo no ambiente onde a droga foi pareada admite-se que a associação foi feita. Animais desnutridos apresentaram condicionamento mesmo em baixas doses de cocaína, doses estas que não produziram efeito no grupo controle. Adicionalmente, para avaliar a influência da desnutrição na sensibilização aos efeitos de recompensa da cocaína, ratos controle e desnutridos receberam injeções de cocaína (5mg/Kg i.p.) durante 10 dias e após 3 dias de abstinência foram submetidos ao teste de preferência condicionada por lugar utilizando duas doses diferentes (3mg/Kg ou 5mg/Kg i.p.). Os animais desnutridos apresentaram efeito de condicionamento em ambas as doses, que foram ineficientes nos animais controle. Também foi demonstrado que os animais desnutridos apresentavam sinais de toxicidade induzida por altas doses de cocaína mais evidentes que os animais controle. A imunohistoquímica também demonstrou que baixas doses de cocaína, que não tiveram efeito nos animais controle, induziram uma maior atividade dopaminérgica em neurônios da área tegmental ventral dos animais desnutridos.

Outro trabalho do mesmo grupo de pesquisadores, desta vez com morfina, mostrou resultados semelhantes. Com o mesmo esquema de RP durante a gestação até P40, foram administradas diferentes doses de morfina e os ratos desnutridos exibiram preferência condicionada por lugar com uma dose menor que não foi eficiente em animais controle. O pré-tratamento com doses crescentes de morfina produziu sensibilização ao efeito de condicionamento com a menor dose de morfina, além disso, estes animais mostram um significativo aumento na expressão de FosB, uma proteína relacionada com o desenvolvimento de adição à drogas e o controle dos sistemas de recompensa no cérebro, no núcleo accumbens, amígdala basolateral e córtex pré-frontal, que são áreas relacionadas com a circuitaria neural de recompensa (Valdomero et al., 2007). Os estudos acima demonstram que a deficiência nutricional durante o período perinatal produz alterações neurais que levam a um aumento dos efeitos de reforço de diferentes drogas.

Já está bem estabelecido na literatura que a RP durante a gestação e/ou lactação também pode modificar outros comportamentos em modelos experimentais. Animais desnutridos submetidos à avaliação dos padrões de comportamento associados à ansiedade como o de transição claro-escuro (Brioni et al., 1989; Santucci et al., 1994), labirinto em cruz elevado (Almeida et al., 1996), labirinto em T

elevado (Hernandes et al., 2003) mostraram alterações que indicavam baixa ansiedade e/ou alta impulsividade.

A RP de 10% em ratos Wistar durante a lactação produz menores níveis de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado na idade adulta. Os animais apresentaram maior frequência de entrada e maior permanência nos braços abertos, alta frequência de *head-dips* e baixa latência para primeira entrada no braço aberto (Françolin-Silva et al., 2006). Françolin-Silva et al (2006), mostrou que a desnutrição protéica durante a lactação produz um efeito ansiolítico comparável ao do diazepam, um benzodiazepínico clássico.

Em testes para avaliar aprendizado e memória, ratos submetidos à dieta hipoprotéica de 6% durante a lactação, apresentaram altas latências para escapar no labirinto aquático de Morris e baixos índices de reconhecimento no teste de memória de reconhecimento no campo aberto, o que indica que estes animais apresentam déficits na memória visuo-espacial (Valadares et al., 2010). Fukuda et al. (2002) submetem ratos a uma RP de 10% durante o período de lactação e se estendendo até o final do período da adolescência (P49; 49º dia de vida pós-natal) e avaliaram o aprendizado visuo-espacial e processos de memória utilizando versões de sinalização proximal e distal do labirinto aquático de Morris. Os animais desnutridos passaram mais tempo nadando em círculos ou explorando a parede do labirinto durante os primeiros ensaios do teste, em contraste com os bem-nutridos, que rapidamente orientaram a navegação na direção do centro do labirinto. Os resultados encontrados se devem, segundo os autores, a alterações produzidas pela RP na formação do hipocampo ou ainda a maior emotividade de ratos desnutridos, considerando o fato de que são mais reativos a estímulos desagradáveis ou aversivos, como água fria.

Ratos Wistar adultos submetidos à RP durante o período perinatal, quando testados no campo aberto, que é usualmente utilizado para avaliação da atividade locomotora, não demonstram diferença em relação à distância percorrida, tanto em machos quanto em fêmeas (Reyes-Castro et al., 2012). No entanto, Ohishi et al (2012), demonstraram que ratas expostas à RP durante o período perinatal, na idade adulta apresentam maior atividade locomotora no teste do campo aberto em relação aos animais controles. Um estudo realizado com ratos submetidos à RP

durante o período da lactação ou durante todo o período de vida até P76, demonstrou que ambos os grupos apresentaram aumento do número de elevações sobre as patas traseiras (*rearing* do original em inglês) em relação ao controle (Camargo et al., 2005). Esta variável pode ser considerada uma medida de atividade exploratória ou locomotora uma vez que tem sido descrito na literatura como componente vertical do comportamento exploratório (Franková, 1973).

Como já comentado, a desnutrição proteica no período neonatal programa para diferentes desordens endócrino-metabólicas que estão associadas com alterações no comportamento dos animais na idade adulta. Porém, não sabemos ainda se as alterações comportamentais observadas nos animais adultos estão presentes desde o insulto original (no período da lactação) ou se estas se surgem mais tardiamente, ao longo do desenvolvimento e maturação dos animais. É esta lacuna do conhecimento que o presente trabalho procura abordar.

1 OBJETIVOS

Considerando-se que a desnutrição durante o período de lactação resulta em alterações metabólicas e endócrinas, as quais podem ocasionar alterações comportamentais, temos como objetivo avaliar, em ratos Wistar, o impacto da programação por dieta hipoprotéica (RP) durante o período de lactação sobre parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade, à atividade locomotora e à memória/aprendizado em diferentes momentos do desenvolvimento do animal, desde o final do período de lactação até a idade adulta.

São objetivos específicos deste trabalho:

- a) avaliar os comportamentos associados à ansiedade das proles nas idades de P21, P45, P90 e PN180 no teste do labirinto em cruz elevado;
- b) avaliar comportamentos associados à atividade locomotora das proles nas idades de P21, P45, P90 e PN180 no teste de campo aberto;
- c) avaliar o desempenho de memória e aprendizado visuo-espacial das proles nas idades de P21, P45, P90 e P180 no labirinto aquático radial de oito braços;
- d) relacionar os achados comportamentais com o conteúdo de catecolaminas das proles nas idades de P21, P45, P90 e P180;
- e) relacionar os achados comportamentais com os níveis de corticosterona sérica das proles nas idades de P21, P45, P90 e P180.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto foi realizado no Laboratório de Neurofisiologia (LN) e no Laboratório de Fisiologia Endócrina (LFE) do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Os experimentos descritos a seguir foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do IBRAG/UERJ (protocolo nº CEUA/183/2007) e estão de acordo com a declaração de Helsinki e com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelos Institutos Nacionais de Saúde (National Institutes of Health - NIH) dos Estados Unidos da América. (Bayne, 1996).

2.1 Animais

Os ratos Wistar utilizados neste trabalho foram criados e mantidos no biotério do LFE com temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (7:00 - 19:00h) controlados. Os animais receberam água filtrada e ração comercial (Nuvilab CR1) *ad libitum* até o início da fase experimental. Os acasalamentos foram realizados com o pareamento de três fêmeas adultas nulíparas com dois machos adultos. Assim que a gravidez foi constatada, cada fêmea grávida foi colocada em gaiola individual para acompanhamento e determinação do dia de nascimento.

2.2 Instalação da malnutrição protéica

Ao nascimento, as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes machos, porque este número de animais parece conferir o maior potencial lactotrófico (Fischbeck;

Rasmussen, 1987), e separadas em dois grupos experimentais: Controle (CONT) e Restrição Proteica (RP). No dia do nascimento (P1), As ratas lactantes do grupo RP receberam a ração hipoprotéica (8% de proteína - preparada em nosso laboratório - Quadro 1) a partir do dia do nascimento da prole até o desmame. As ratas lactantes do grupo CONT receberam ração comercial para roedores (Nuvilab CR1) durante este período. As rações hipoprotéica e comercial (controle) divergem no percentual de proteínas, carboidratos e lipídeos (estes dois últimos estão aumentados a fim de manter a dieta isocalórica apesar de restrita em proteínas - Quadro 2). Após o desmame (P21), tanto a prole RP quanto a CONT receberam ração comercial.

Ingredientes	Mistura de sais
Aderogil (vitamina D3 e A) - 1 ml	Carbonato de Cálcio - 87 g
Complexo B - 1 ml	Fosfato de potássio dibásico - 123 g
Vitamina K - 75µl	Fosfato de cálcio - 28 g
Vitamina E - 1 gota	Sulfato de magnésio - 32 g
Vitamina C - 5 ml	Cloreto de sódio - 49 g
Vitamina B12 - 10 µl	Citrato férrico - 2 g
Ácido fólico - 2 mg	Iodeto de potássio - 0,2 g
Óleo de soja - 32 ml	Sulfato de manganês - 0,2 g
Mistura de sais - 32 g	Sulfato de zinco - 0,09 g
Maisena - 591 g	Sulfato de cobre - 0,09 g
Ração comercial - 348 g*	

Quadro 1- Ingredientes utilizados no preparo da ração artesanal

Legenda: * utilizada como fonte protéica.

Modo de preparo		
Acrescentou-se amido de milho (maizena) à ração, obtendo-se assim uma ração hipoprotéica e isoenergética. Foram acrescentados também minerais e vitaminas. A quantidade de amido, minerais e vitaminas acrescentados à ração padrão foi calculada para suprir a diminuição do conteúdo energético, de minerais e de vitaminas decorrente da mistura feita para obter a ração hipoprotéica.		
Composição		
	Nuvilab CR-1	Hipoprotéica
Proteínas	22,0%	8,0%
Carboidratos	73,1%	81,0%
Lipídeos	5,9%	11,0%

Quadro 2- Modo de preparo e composição das rações utilizadas

2.3 Consumo de ração, massa corporal e desenvolvimento somático

As massas corporais totais das progenitoras e dos filhotes foram avaliadas de 4 em 4 dias durante a lactação. A quantidade de ração ingerida pelas ratas lactantes foi avaliada diariamente durante o mesmo período. A quantidade ingerida foi calculada pela diferença entre a quantidade da ração que restou na gaiola e a quantidade colocada no dia anterior.

2.4 Testes comportamentais

Os animais nas idades de P21, P45, P90 e P180 (n = 20 em cada grupo estudado) foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Campo Aberto (CA) e Labirinto Aquático Radial de Oito Braços (LAROB). Todos os testes foram feitos no mesmo ambiente, sempre a partir das 18 h. Um animal foi testado apenas em uma única idade e somente um animal de cada ninhada era testado por idade.

2.4.1 Labirinto em cruz elevado

Os animais foram testados no labirinto em cruz elevado (LCE - Figura 1), que é considerado como um dos melhores testes para análise de ansiedade em modelos experimentais, sendo frequentemente utilizado para a avaliação do efeito de drogas ansiolíticas (Sala-Roca et al., 2002; Carobrez; Bertoglio, 2005). Antes do início de cada teste, as gaiolas dos animais foram transportadas para a sala de teste, local em que os animais foram ambientados por 1 h antes do teste. O equipamento tem formato em cruz e consiste em 2 braços abertos (BA: 10 cm de largura x 50 cm de comprimento), 2 braços fechados (BF: 10 cm de largura x 50 cm de comprimento x

40 cm de altura), dispostos perpendicularmente, e uma área central (CN) entre os braços, elevados 50 cm acima do chão. Os ratos foram colocados individualmente no centro do equipamento, virados para um dos braços abertos, tendo 5 min para explorar o labirinto. Após o término de cada teste, o LCE era limpo com papel toalha umedecido com uma solução de etanol (50%) com o intuito de eliminar as excretas e minimizar odores que pudessem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados subsequentemente. Todos os testes foram filmados por uma câmera de vídeo posicionada a 1,60 m acima do LCE para análise posterior. A análise comportamental foi feita a partir dos vídeos. As variáveis relacionadas à ansiedade analisadas foram:

- a) Tempo BA: tempo total de permanência no braço aberto;
- b) %Tempo BA: percentual de tempo de permanência no braço aberto [$\text{Tempo BA} / (\text{Tempo BA} + \text{Tempo BF})$];
- c) Entradas BA: número de entradas no braço aberto;
- d) %Entradas BA: percentual de entradas no braço aberto [$\text{Entradas BA} / (\text{Entradas BA} + \text{Entradas BF})$].

Também foram avaliados parâmetros etológicos (Carola et al., 2002; Rodgers; Dalvi, 1997; Fraga et al., 2009, 2010) como:

- a) Entradas BF: número de entradas no braço fechado (medida de atividade locomotora);
- b) %Tempo CN: percentual de tempo no centro ($\text{Tempo CN} / \text{Tempo Total}$ - medida de tomada de decisão);
- c) Alongamentos (*stretched attend posture* no original em inglês): o animal estica-se para fazer exploração sem dar passos - medida de avaliação de risco;
- d) Atividade vertical (*rearing*): levantamento sobre as patas traseiras - medida de atividade motora;
- e) Auto-limpeza (*grooming*): utilizado como medida de atividade motora;
- f) Avaliação de risco (*head-dipping*): movimentos de exploração com a cabeça passando abaixo do nível do piso do labirinto - medida de exploração;

g) Retornos BF: retornos ao braço fechado do qual acabou de sair.



Figura 1- Fotografia do labirinto em cruz elevado

2.4.2 Campo aberto

Desde o seu desenvolvimento na primeira metade do século passado (Hall 1934), o teste de campo aberto (CA - Figura 2) vem sendo amplamente utilizado e é hoje uma das ferramentas mais populares para o estudo da atividade locomotora em roedores (Prut; Belzung 2003; Whishaw et al., 2006). Além disso, com base no fato de que os roedores têm uma tendência natural de evitar espaços abertos, a atividade medida na parte central do campo é utilizada como um indicador de ansiedade (Choleris et al., 2001; Prut; Belzung, 2003). Um aumento da atividade ou permanência na porção central do campo pode ser interpretado como o resultado de um efeito ansiolítico, enquanto que o contrário, isto é, a diminuição destas medidas, como resultado de um efeito ansiogênico (Prut; Belzung, 2003).

A arena do teste de campo aberto consiste de uma caixa retangular de polipropileno (37,6 x 30,4 x 17,0 cm), que foi dividida em 16 retângulos (9,4 cm x 7,6

cm), sendo 12 periféricos e 4 centrais. Para realização dos testes, os animais foram colocados na borda da caixa. O tempo de duração da sessão experimental foi de 5 min. Após o fim de cada teste, o CA era limpo com papel toalha umedecido com uma solução de etanol (50%) com o intuito de eliminar excretas e minimizar odores que poderiam interferir no comportamento dos animais testados subsequentemente. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo posicionada a um metro acima da caixa e a avaliação do comportamento foi feita a partir do material gravado. Para a análise do comportamento no campo aberto, foram registrados escores de locomoção ao longo de intervalos de 1 minuto. Para que uma unidade de locomoção fosse contada, era necessário que o animal passasse com as quatro patas por um retângulo. A seguinte variável relacionada à atividade locomotora foi avaliada: Locomoção TT: total de retângulos percorridos no CA.

As variáveis relacionadas à ansiedade analisadas foram:

- a) Tempo centro (CE): tempo de permanência nos quatro retângulos centrais do CA;
- b) Locomoção CE: número de retângulos centrais percorridos no CA;
- c) %Locomoção CE: percentual de retângulos percorridos no centro do CA (Locomoção CE / Locomoção total (TT)).

Também foram avaliados os seguintes parâmetros etológicos:

- a) Atividade vertical: levantamento sobre as patas traseiras - medida de atividade motora;
- b) Auto-limpeza: também utilizado como medida de atividade motora.



Figura 2- Fotografia do campo aberto

2.4.3 Labirinto aquático radial de oito braços

Os animais foram testados no labirinto aquático radial de 8 braços (LARO - Figura 3), teste que tem sido utilizado para avaliar diferentes aspectos da memória e da aprendizagem visuo-espacial (Xavier et al., 1999; Fraga et al, 2009,2010). Antes do início de cada teste, as gaiolas dos animais foram transportadas para a sala de teste, que tinha as mesmas condições de temperatura do biotério, sendo que os animais foram ambientados por 1 h antes do início dos testes. O LARO é composto por uma arena central com 41 cm de diâmetro com oito braços retangulares radialmente dispostos em relação à arena central formando uma espécie de asterisco (braços: 29 cm comprimento x 13 cm de largura x 40 cm de altura). O LARO foi preenchido com água (26°C) com uma profundidade de 34 cm. Logo, os ratos não conseguiam tocar o fundo com as patas ou com a cauda. Na extremidade final de cada um de seus braços pode ser posicionada uma plataforma a 1 cm abaixo da superfície que permite ao animal escapar do labirinto (plataforma de escape: 8 cm de comprimento x 10 cm de largura). Uma tinta atóxica (tinta guache) foi utilizada para tornar a água opaca para não permitir a visualização da plataforma de escape. O teste foi iniciado colocando-se o animal no centro da piscina, voltado em direção a um dos braços sem a plataforma. A direção de entrada no LARO variou entre animais, porém, para cada animal, o posicionamento de entrada foi mantido durante todo o período de teste. Os animais foram testados 4 vezes por dia, com intervalo de 15 minutos entre uma tentativa e outra, durante 5 dias. O animal teve dois minutos para achar a plataforma. Caso o animal não a encontrasse, ele era levado para a plataforma, sendo deixado por 20 s sobre a mesma. Para os quatro primeiros dias, a plataforma foi mantida na sua posição original. No quinto dia, a plataforma foi colocada no braço oposto ao seu posicionamento original (*probe trial*). A sala de teste tinha fixadas à parede pistas espaciais, que nada mais eram do que placas de acrílico de diferentes formatos e de cor preta, para auxiliar na orientação dos animais. Entre cada teste os resíduos presentes na água foram retirados. Os testes foram gravados por uma câmera de vídeo posicionada a 1,30 m acima do

LAROB para análise posterior do comportamento. As seguintes variáveis relacionadas ao desempenho de memória e aprendizado foram analisadas:

- a) Latência: latência (em segundos) para encontrar a plataforma de escape ao longo dos quatro primeiros dias de teste (plataforma localizada na mesma posição);
- b) Latência Probe: latência (em segundos) para encontrar a plataforma de escape ao longo no *probe trial* (quinto dia de teste - plataforma localizada na posição oposta à original).

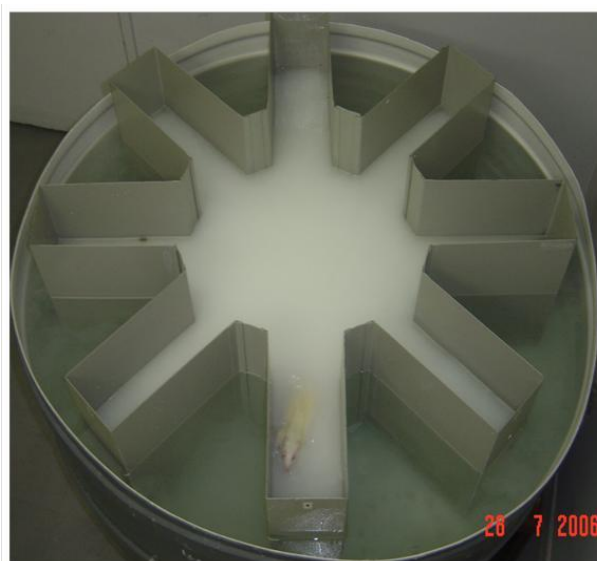


Figura 3- Fotografia do labirinto aquático radial de 8 braços

2.5 Avaliação da função adrenal:

Após os testes comportamentais (aos 21, 45, 90 ou 180 dias de idade), a massa corporal dos animais dos grupos CONT e RP foi verificada e em seguida estes foram sacrificados por decapitação para coleta de amostras de sangue para quantificação da corticosteronemia e da glândula adrenal para avaliar o conteúdo de catecolaminas. O sangue foi centrifugado a 2500 rpm, por 25 min para obtenção do soro, que foi congelado a -45°C para posterior análise.

2.5.1 Corticosterona

Determinada a partir das amostras obtidas das proles por radioimunoensaio (RIE) específico (ImmuChemTM125 I, duplo anticorpo, ICN Biomedicals, Inc, USA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi 7,1%.

2.5.2 Catecolaminas

A dosagem do conteúdo de catecolaminas totais na adrenal foi realizada pelo método fluorimétrico do trihidroxiindol (Trevenzoli et al., 2007). As glândulas adrenais esquerdas foram cuidadosamente dissecadas, pesadas em balança de precisão e armazenadas a -20°C até o processamento do tecido. Para extrair as catecolaminas, as adrenais foram homogeneizadas manualmente em ácido acético 10% e centrifugadas (1.129g/5 min), para utilização do sobrenadante. No ensaio fluorimétrico, utilizamos padrões de adrenalina (Adren®, Hipolabor, Brasil) diluída em ácido acético 10%. Em 50 µL de cada padrão ou amostra, adicionamos 250 µL de tampão fosfato 0,5 M, pH 7,0 e 25 µL de ferricianeto de potássio 0,5%. A solução foi homogeneizada, incubada por 20 minutos e paralisada com 500 µL de ácido ascórbico (60mg/mL)/NaOH 5M, na proporção 1:19. Adicionamos 2 mL de água destilada, sendo a solução novamente homogeneizada e submetida à leitura em espectrofluorímetro (Victor3, PerkinElmer, Brasil Ltda). Os comprimentos de onda para a leitura foram 420 nm de excitação e 510 nm de emissão. As dosagens foram feitas em duplicata, com os tubos de ensaio sob refrigeração durante todo o procedimento.

2.6 Estatística

2.6.1 Aspectos preliminares

Todas as distribuições de dados foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para uma amostra. As avaliações de normalidade foram feitas para cada grupo experimental separadamente. Para valores de $P \geq 0,05$ (bicaudal), as distribuições foram consideradas paramétricas e as análises posteriores foram realizadas considerando-se esta característica. Os dados com distribuição paramétrica serão apresentados como médias \pm erros padrão das médias.

2.6.2 Massa corporal e ingestão de ração

As massas corporais das progenitoras (entre P1 e P21) e das proles (entre P1 e P21) foram analisadas independentemente através de análises de variância com medidas repetidas (ANOVAR). O fator utilizado foi o GRUPO (RP e CONT). O fator de repetição utilizado foi o DIA e a variável utilizada foi a massa corporal em gramas (g). Os dados de massa corporal da prole de P21 a P180 foram analisados com uma ANOVA bi-fatorial univariada onde o GRUPO e a IDADE (21, 45, 90 e 180) foram considerados como fatores e a variável utilizada foi a massa corporal em gramas. O consumo de ração foi analisado através de uma ANOVAR (entre P1 e P21) onde o fator utilizado foi o GRUPO. O fator de repetição utilizado foi o DIA e a variável utilizada foi a massa (em gramas) de ração consumido diariamente.

2.6.3 Parâmetros comportamentais

A análise dos comportamentos apresentados no LCE iniciou-se com uma ANOVA multivariada em que os seguintes fatores foram utilizados: GRUPO e IDADE (P40 e P90). Para o CA, o mesmo procedimento estatístico foi utilizado para iniciar a análise. O desempenho de memória e aprendizado no LAROB foi inicialmente analisado através de uma ANOVA com os seguintes fatores: GRUPO e IDADE. Os fatores de repetição foram o DIA (1^o ao 4^o) e a TENTATIVA (1^a a 4^a). Os resultados do quinto dia de teste (probe trial) foram também analisados através de uma ANOVA com os mesmos fatores indicados anteriormente. No entanto, como fator de repetição foi utilizada somente a TENTATIVA.

2.6.4 Parâmetros endócrinos

O conteúdo de catecolaminas foi analisado através de uma ANOVA bi-fatorial univariada onde o GRUPO e a IDADE (21, 45, 90 e 180) foram considerados como fatores e a variável utilizada foi a concentração de catecolaminas em μM . A concentração de corticosterona no soro catecolaminas foi analisada através de uma ANOVA bi-fatorial univariada onde o GRUPO e a IDADE (21, 45, 90 e 180) foram considerados como fatores e a variável utilizada foi a concentração de corticosterona em ng/ml.

2.6.5 Aspectos complementares

Quando necessário, ANOVAs de menor ordem seguidas do teste de Fisher para comparações par a par (Fisher protected least square difference test do original em inglês) foram utilizados post-hoc para as análises paramétricas.

Os efeitos de fatores individuais foram considerados significativos quando $P < 0,05$ (bi-caudal). Para interações entre fatores, nos casos em que $P < 0,10$ (bi-caudal) os fatores interativos foram separados e as ANOVAs repetidas para verificar se os efeitos eram mantidos (Snedecor; Cochran, 1967).

Para a realização das ANOVAs de repetição, inicialmente era testada a hipótese de que a matriz de covariância das variáveis dependentes eram similares entre grupos pelo teste de Box. Em seguida, testou-se a hipótese de que as variâncias de erro das variáveis dependentes eram similares entre grupos pelo teste de Levene. Finalmente, a hipótese de esfericidade era testada pelo teste de Mauchly. A esfericidade assume igualdade de variâncias para todos os pares das medidas realizadas com repetição. Cumpre ressaltar que o teste de Mauchly é altamente sensível às violações de normalidade (Keselman et al., 1980). Na situação de rejeição de esfericidade optou-se por corrigir o número de graus de liberdade da análise de variância através do parâmetro ϵ (Huynh; Feldt, 1976).

3 RESULTADOS

3.1 Massa corporal e ingestão de ração

3.1.1 Massa corporal das progenitoras

A evolução da massa corporal das progenitoras durante a lactação é mostrada na Figura 4. Os dados mostram que as progenitoras do grupo RP apresentaram uma redução progressiva de massa ao longo do período de lactação quando comparadas as progenitoras CONT (DIA x TRATAMENTO: $F = 69,1$; $gl = 6$; $P < 0,001$).

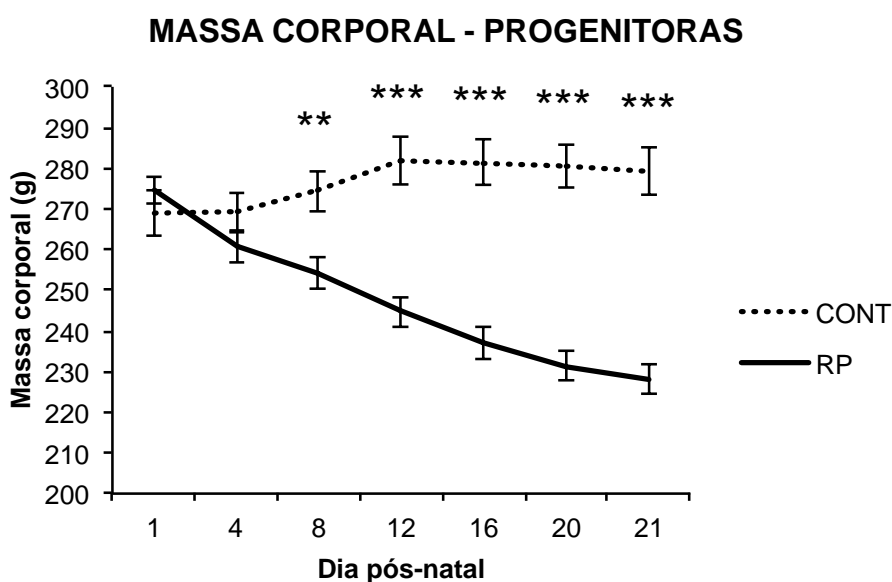


Figura 4- Evolução da massa corporal das progenitoras

Legenda: progenitoras que receberam dieta comercial (CONT: $n = 21$) ou que foram submetidas à restrição protéica (RP: $n = 21$) durante a lactação.

Nota: dados expressos como média \pm EPM. ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.1.2 Massa corporal das proles

A evolução da massa corporal da prole durante a lactação é mostrada na Figura 5 (DIA: $F = 1591,3$; $gl = 1,7$; $P < 0,001$). Os dados mostram que a prole RP apresentou um menor ganho de massa corporal ao longo do período de lactação quando comparada a prole CONT (DIA x TRATAMENTO: $F = 191,3$; $gl = 1,7$; $P < 0,001$), levando o grupo RP a apresentar uma massa corporal menor que o grupo CONT a partir de P4. Como se pode verificar na Figura 6, o grupo RP continuou a apresentar menor ganho de massa que o grupo CONT ao longo de todo o período restante do experimento.

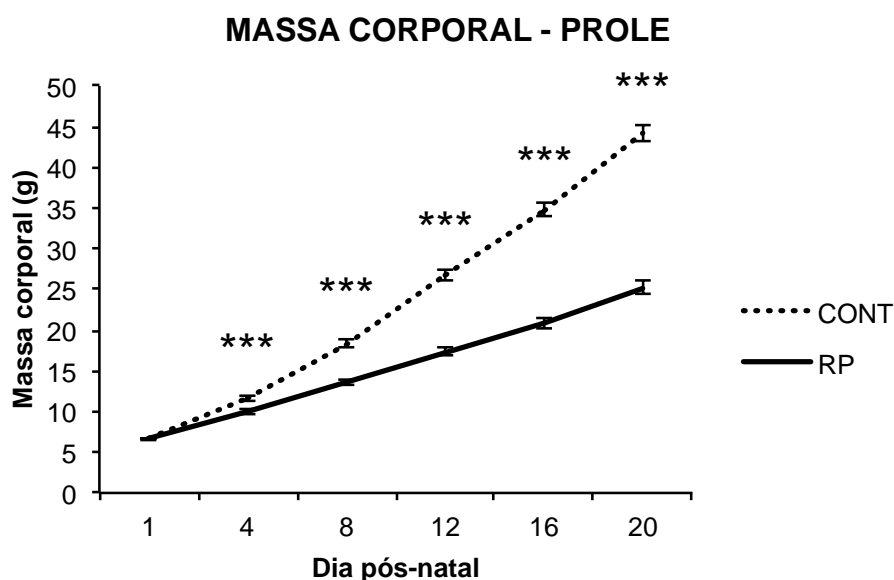


Figura 5- Evolução da massa corporal das proles

Legenda: proles cujas progenitoras receberam dieta comercial (CONT: $n = 21$) ou que foram submetidas à restrição protéica (RP: $n = 21$) durante a lactação

Notas: dados expressos como média \pm EPM. *** $P < 0,001$.

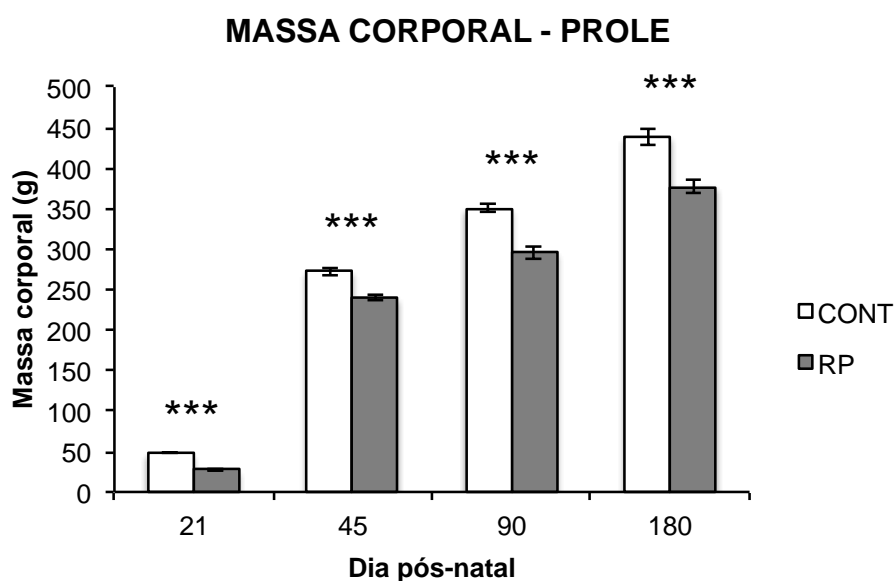


Figura 6- Evolução da massa corporal após a lactação

Legenda: proles cujas progenitoras receberam dieta comercial (CONT: n = 21) ou que foram submetidas à restrição protéica (RP: n = 21) durante a lactação
 Notas: dados expressos como média \pm EPM. ***P < 0,001.

3.1.3 Ingestão de ração

O consumo de ração dos grupos CONT e RP durante a lactação é apresentado na Figura 7. Enquanto o consumo dos animais CONT aumentou ao longo de todo o período, o consumo dos animais RP se estabilizou em valores inferiores aos do grupo CONT, de P5 em diante, o que explica a interação GRUPO x DIA significativa (F = 17,3; gl = 10,8; P < 0,001). Mesmo quando o consumo de ração é corrigido pela massa de animais presentes na gaiola (Figura 8) observa-se que o mesmo é sempre maior e crescente no grupo CONT enquanto que no grupo RP o consumo corrigido se estabiliza a partir de P8 (GRUPO x DIA: F = 5,9; gl = 4,0; P < 0,001).

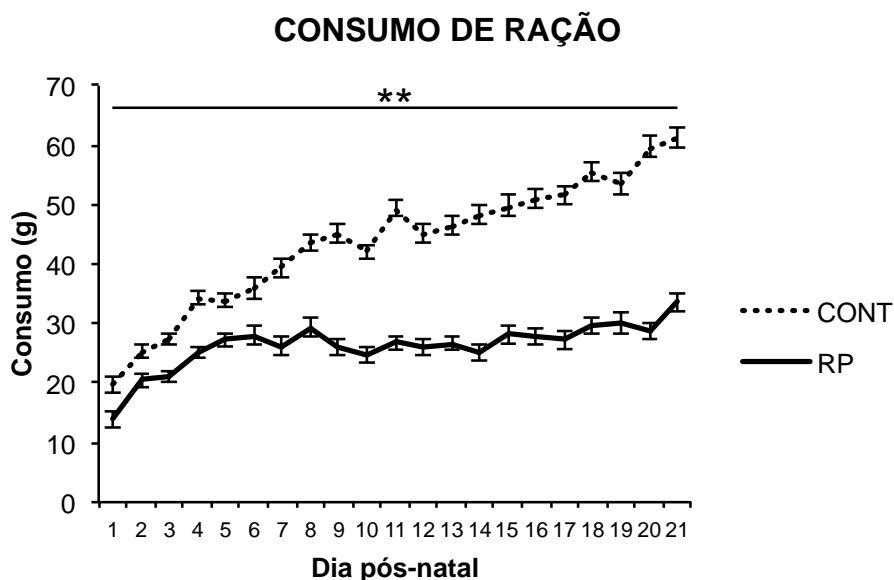


Figura 7- Evolução da ingestão de ração (valores absolutos)
 Legenda: nos grupos que receberam dieta comercial (CONT: n = 21) ou que foram submetidos à restrição protéica (RP: n = 21) durante a lactação
 Nota: dados expressos como média \pm EPM. -**P < 0,01.

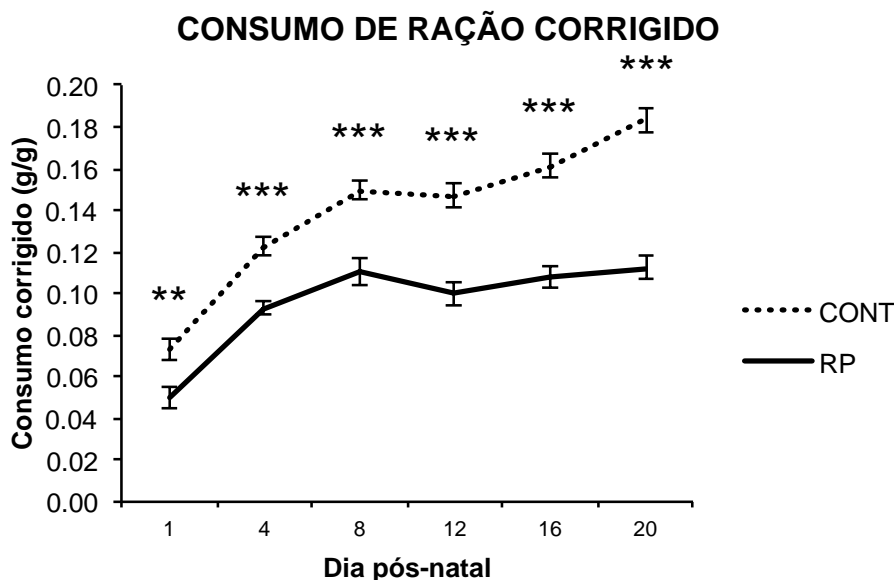


Figura 8- Evolução da quantidade de ração ingerida (valores relativos)
 Legenda: durante por animais que receberam dieta comercial (CONT: n = 21) ou que foram submetidos à restrição protéica (RP: n = 21) durante a lactação.
 Notas: dados expressos como média \pm EPM. **P < 0,01 , ***P < 0,001.

3.2 Testes comportamentais

3.2.1 Teste do labirinto em cruz elevado

A ANOVAr global do LCE indicou um efeito significativo da IDADE ($F = 2,7$; $gl = 3$; $P < 0,05$) e uma interação VARIÁVEL x IDADE ($F = 20,1$; $gl = 8,6$; $P < 0,001$) também significativa. As análises seguintes foram feitas para cada idade separadamente.

Para os dados associados com a ansiedade (Figuras 9 e 10), verificou-se que os animais RP testados em P21 apresentavam alterações quando comparados com os animais CONT. Foram observados aumentos significativos dos valores de Tempo BA ($F = 5,9$; $gl = 1$; $P < 0,05$), %Tempo BA ($F = 5,3$; $gl = 1$; $P < 0,05$), Entradas BA ($F = 9,5$; $gl = 1$; $P < 0,01$) e %Entradas BA ($F = 6,3$; $gl = 1$; $P < 0,05$) no grupo RP. Não foram observadas alterações significativas nas outras idades.

Em relação aos demais parâmetros comportamentais no LCE, somente a avaliação de risco mostrou-se alterada, também em P21: os animais RP apresentaram um número maior de eventos associados a avaliação de risco do que o grupo CONT ($F = 5,8$; $gl = 1$; $P < 0,05$) (Figura 15). Não foram observadas outras alterações significativas nos parâmetros etológicos (Figuras 11 a 17).

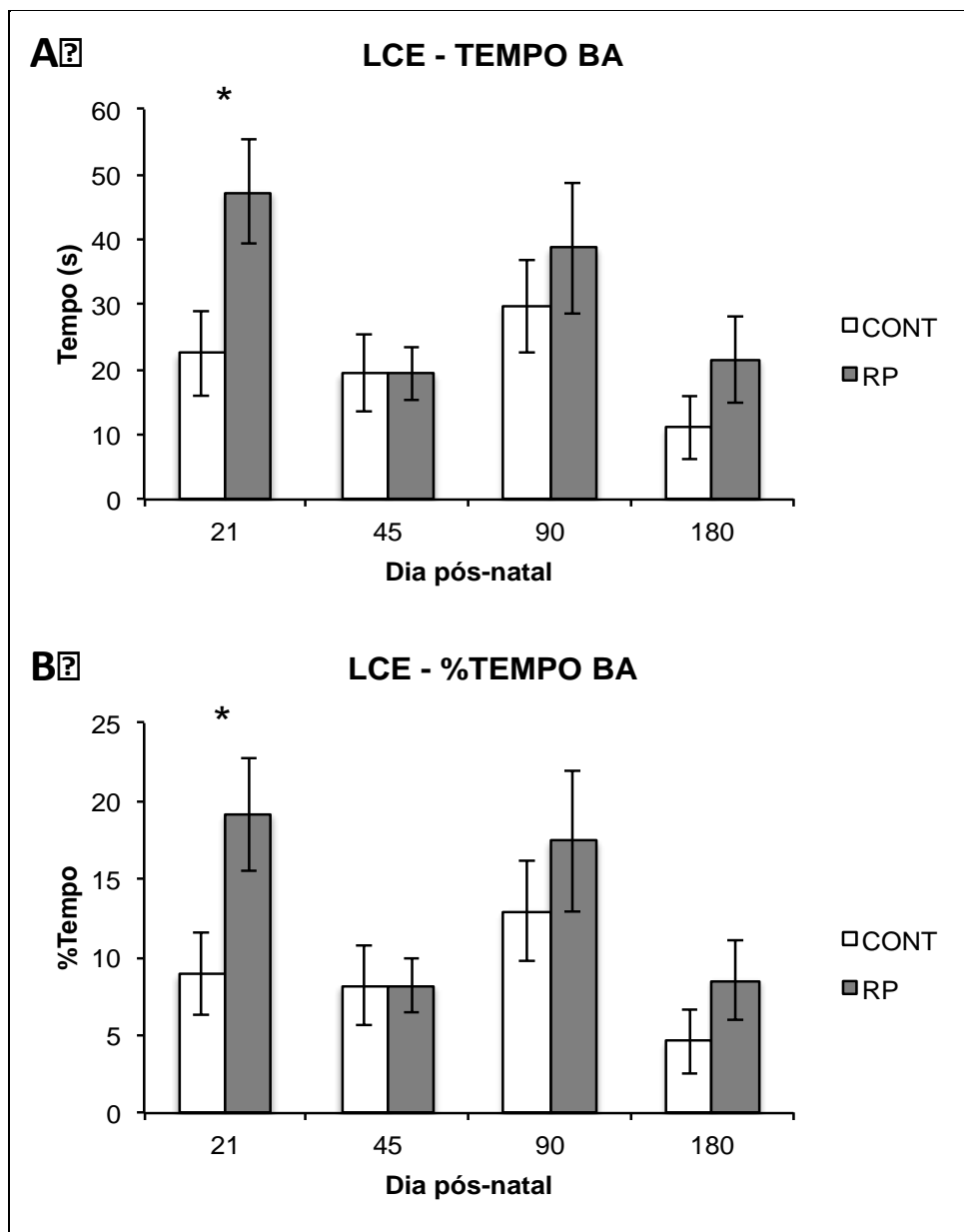


Figura 9- Tempo no braço aberto (A) e percentual de tempo no braço aberto (B) no LCE, segmentados por grupo e idade
 Legenda:(CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).
 Nota:dados expressos como média \pm EPM. *P < 0,05.

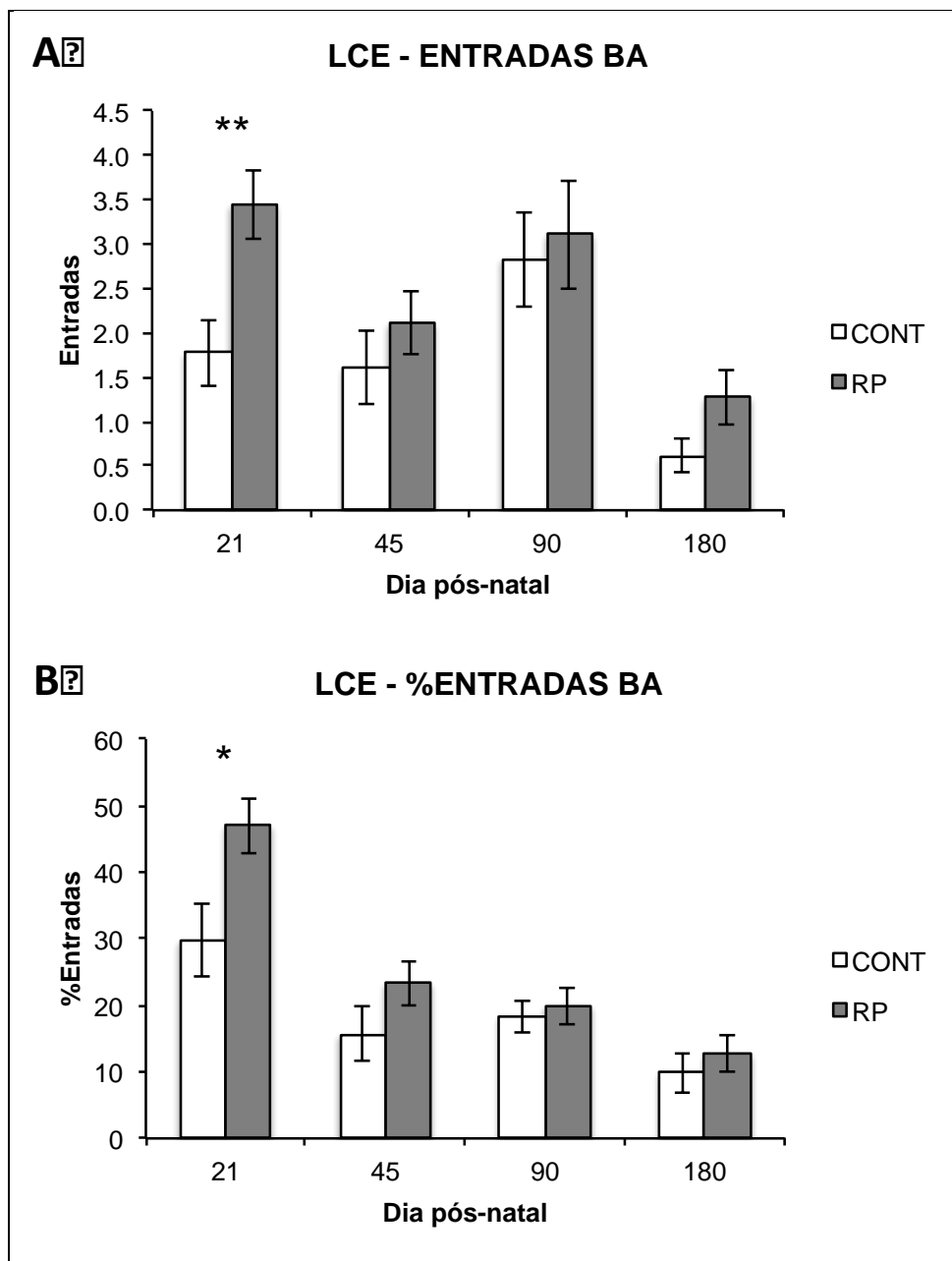


Figura 10- Entradas no braço aberto (A) e percentual de entradas no braço aberto (B) no LCE, segmentados por grupo e idade

Legenda:(CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).

Nota:dados expressos como média \pm EPM. *P < 0,05, **P < 0,01.

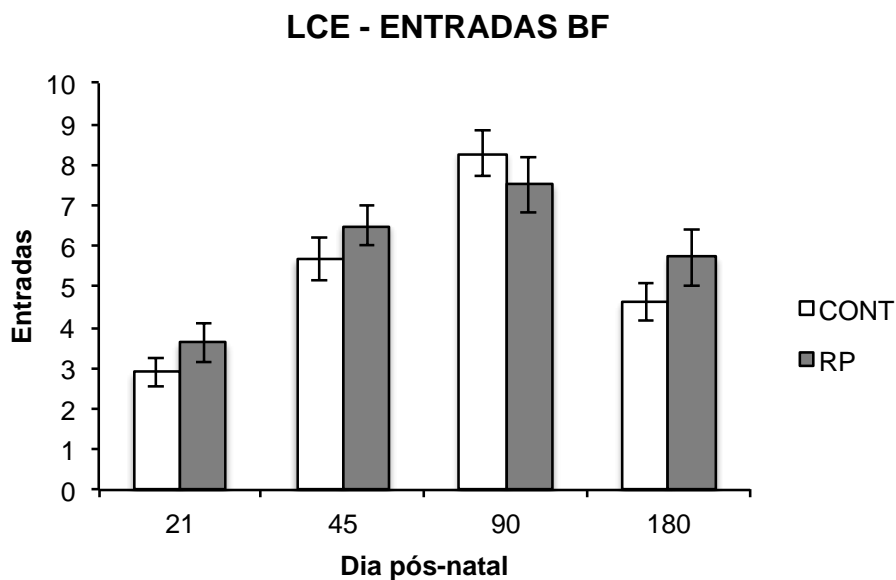


Figura 11- Entradas no braço fechado no LCE, segmentado por grupo e idade
 Legenda:(CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).
 Nota:dados expressos como média \pm EPM.

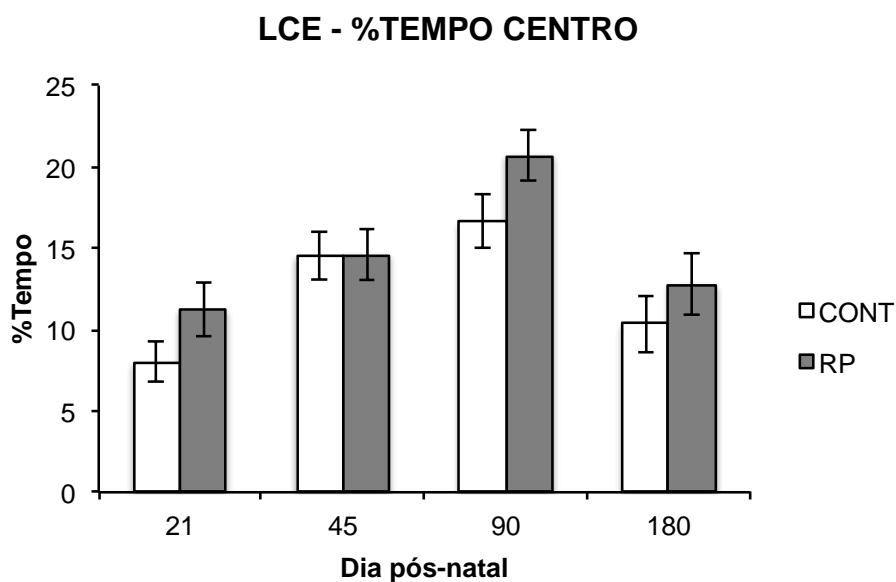


Figura 12- Percentual de tempo no centro no LCE, segmentado por grupo e idade
 Legenda:(CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).
 Nota:dados expressos como média \pm EPM.

LCE - ALONGAMENTOS

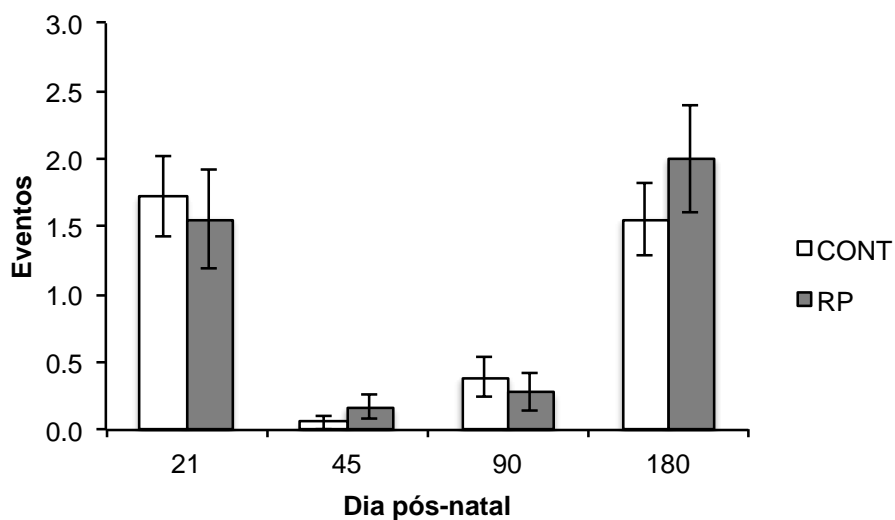


Figura 13 - Número de alongamentos no LCE, segmentado por grupo e idade
 Legenda: (CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade)
 Nota: Dados expressos como média ± EPM.

LCE - ATIVIDADE VERTICAL

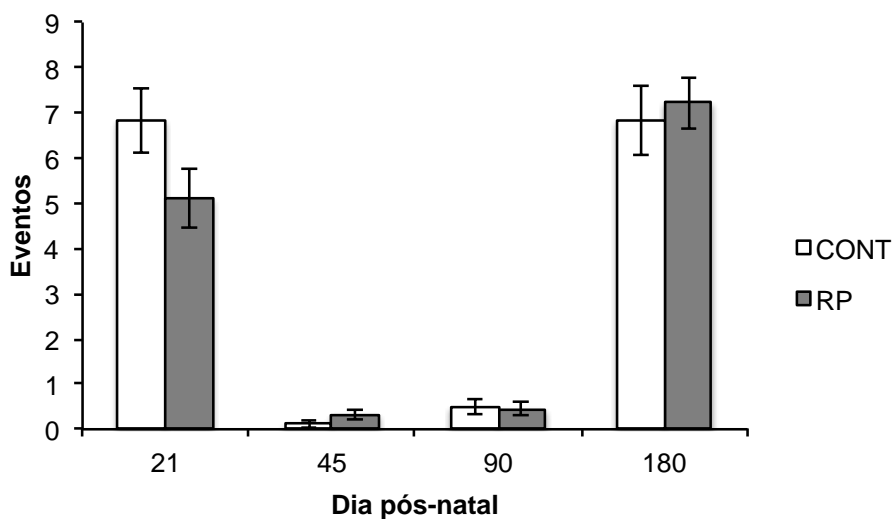


Figura 14- Número de eventos de atividade vertical no LCE, segmentado por grupo e idade
 Legenda: (CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).
 Nota: Dados expressos como média ± EPM.

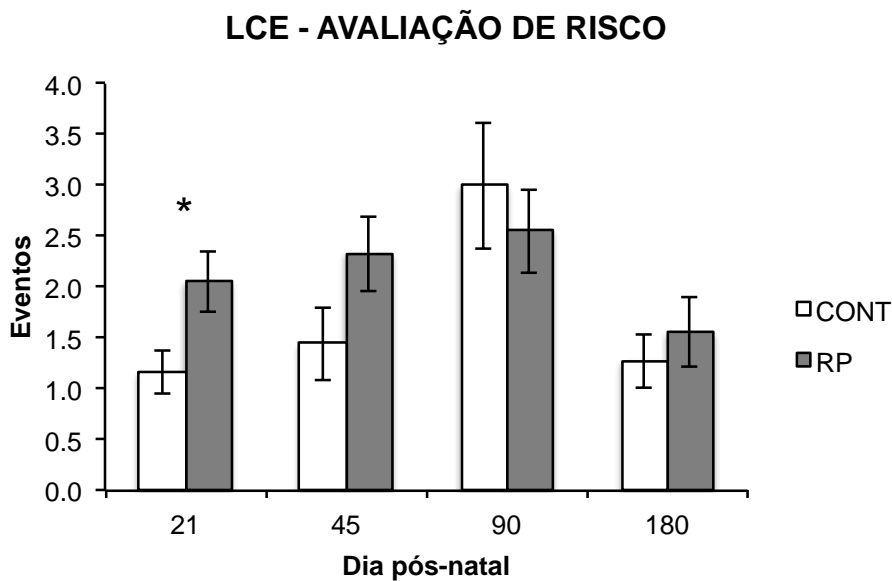


Figura 15- Número de eventos de avaliação de risco no LCE, segmentado por grupo e idade

Legenda:(CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).

Nota:Dados expressos como média ± EPM. *P < 0,05.

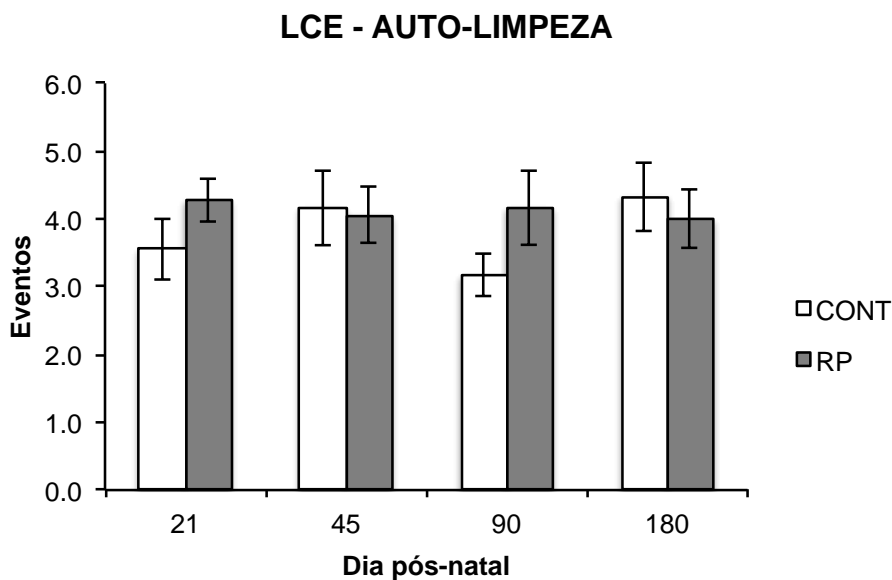


Figura 16-Número de eventos de auto-limpeza no LCE, segmentado por grupo e idade

Legenda:(CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).

Nota:Dados expressos como média ± EPM.

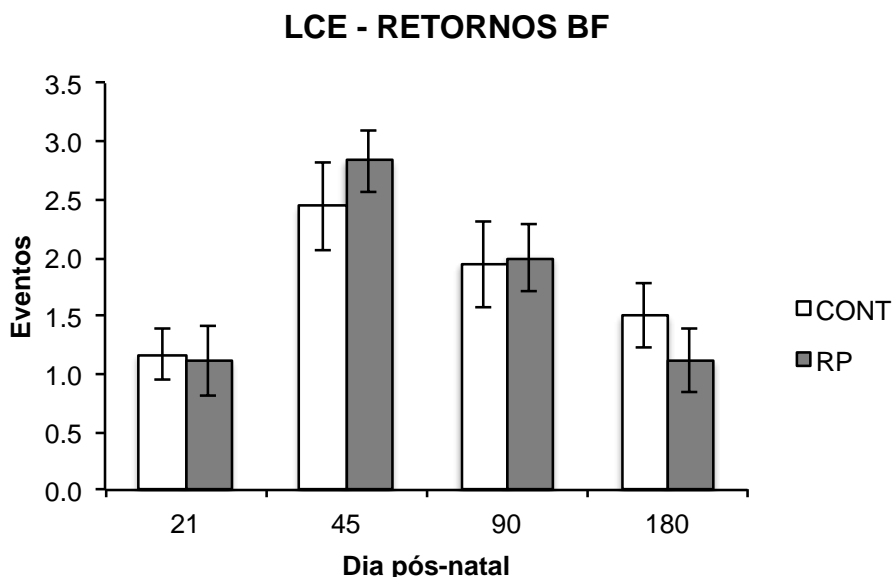


Figura 17- Número de eventos de retorno para o braço fechado no LCE, segmentado por grupo e idade

Legenda: (CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).

Nota: Dados expressos como média ± EPM.

3.2.2 Teste do campo aberto

A ANOVA global do CA indicou um efeito significativo da IDADE ($F = 8,7$; $gl = 3$; $P < 0,001$) e uma interação VARIÁVEL x IDADE ($F = 6,7$; $gl = 3,6$; $P < 0,001$) também significativa. As análises seguintes foram feitas para cada idade separadamente.

Para os dados associados com a atividade locomotora (Figura 18), verificou-se que os animais RP testados em P90 apresentavam alterações quando comparados com os animais CONT. Foi observado uma redução significativa na locomoção total ($F = 10,7$; $gl = 1$; $P < 0,01$) no grupo RP. Não foram observadas alterações significativas nas outras idades.

Em relação aos dados associados com medidas de ansiedades (Figuras 19 e 20), somente se observou em efeito da restrição protéica nos animais em P90: os animais RP permaneciam significativamente menos tempo no centro (Tempo CE - $F = 4,9$; $gl = 1$; $P < 0,05$) do CA do que os animais controle (Figura 19). Não foram

observadas alterações nesta variável nas outras idades. Também não foram observadas diferenças entre grupos para as variáveis Tempo CE e %Tempo CE (Figura 20).

Em relação aos demais parâmetros comportamentais no CA, a atividade vertical (Figura 21) estava significativamente aumentada somente nos animais P21 do grupo RP ($F = 5,8$; $gl = 1$; $P < 0,05$). Adicionalmente, o número de eventos de auto-limpeza (Figura 22) estava significativamente reduzido em animais P90 deste grupo ($F = 5,8$; $gl = 1$; $P < 0,05$). Não foram observadas outras diferenças significativas entre grupos em relação a estes parâmetros.

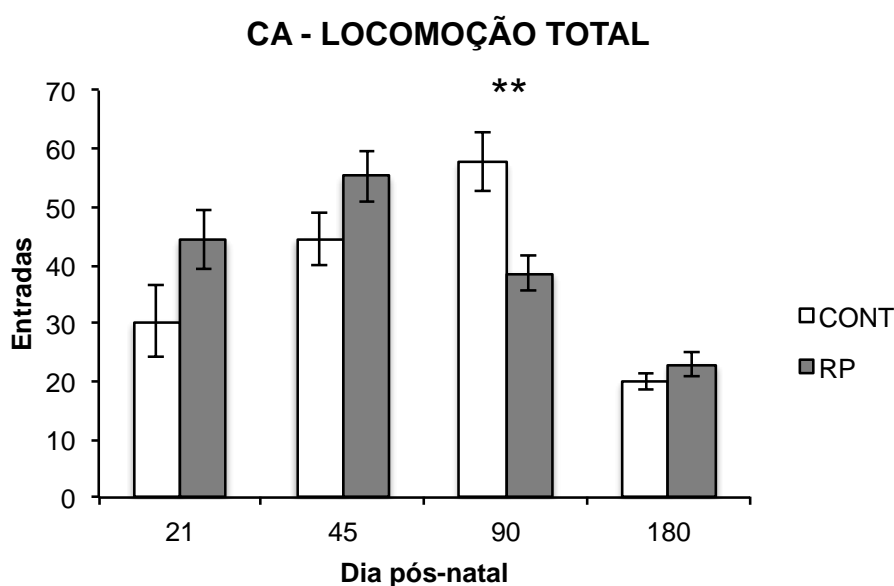


Figura 18- Números de entradas totais no CA, segmentado por grupo e idade
 Legenda: (CONT: $n = 18$; RP: $n = 18$, por idade).

Nota: Dados expressos como média \pm EPM. ** $P < 0,01$.

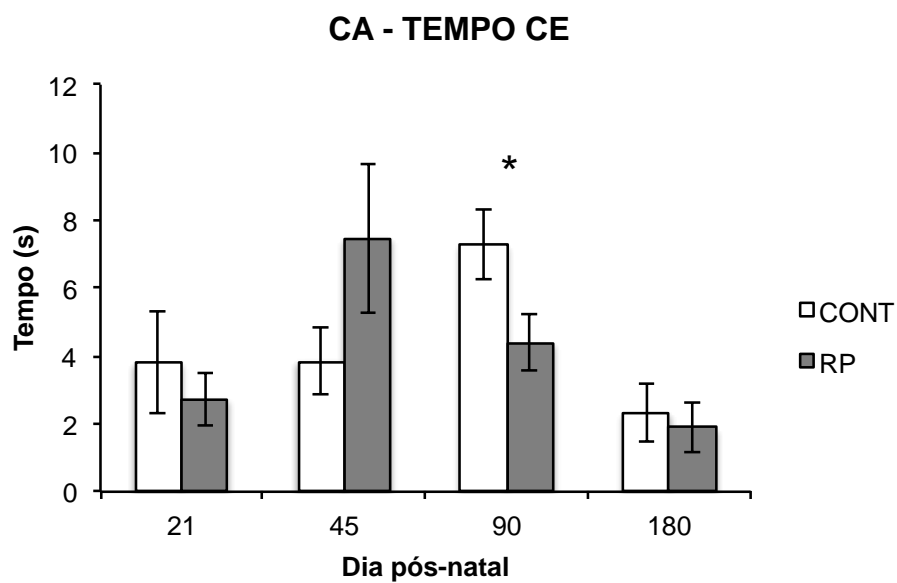


Figura 19- Tempo no centro no CA, segmentado por grupo e idade
Legenda:(CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).
Nota:Dados expressos como média \pm EPM. *P < 0,05.

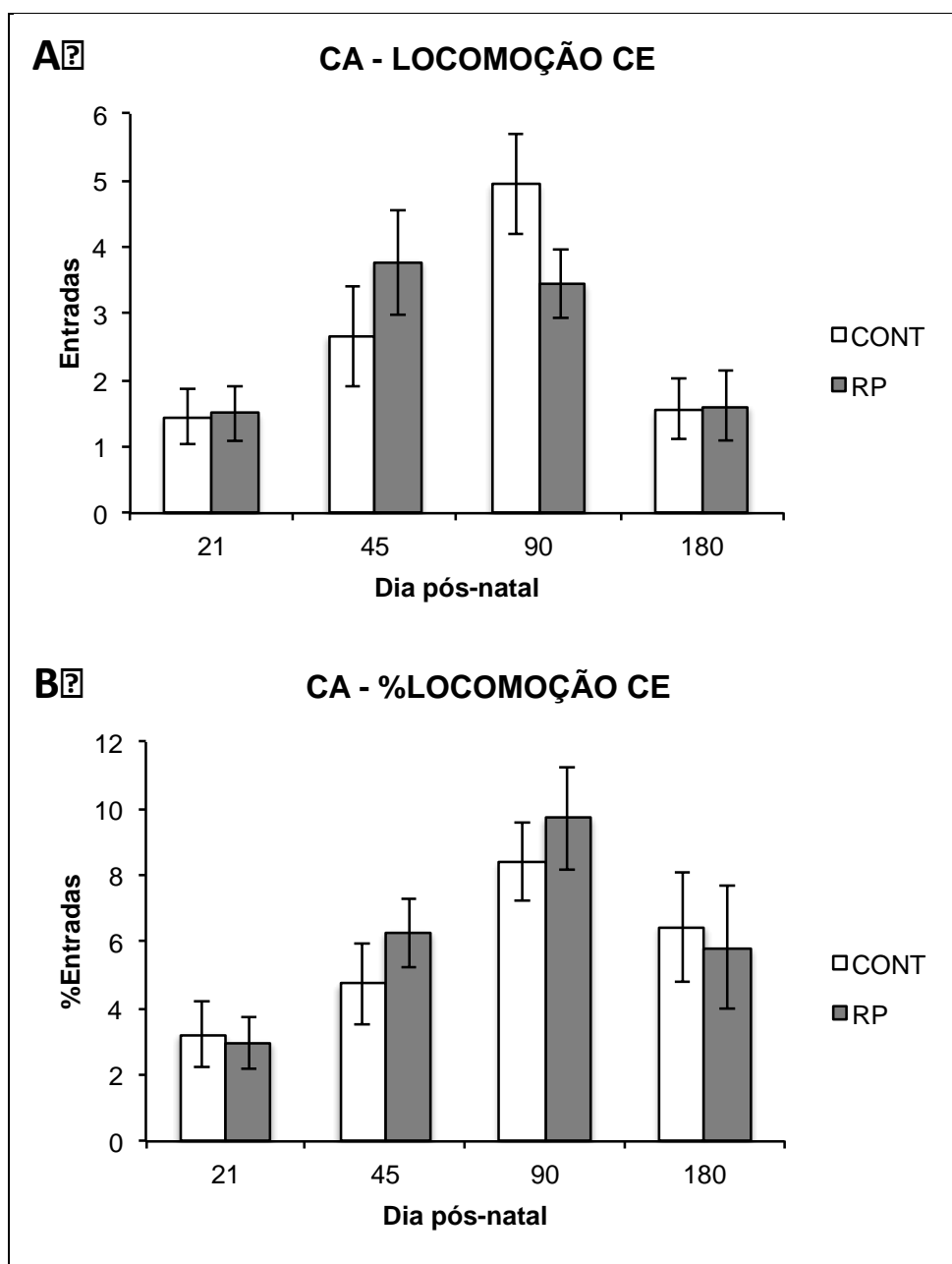


Figura 20- Entradas no centro (A) e percentual de entradas no centro (B) no CA, segmentados por grupo e idade

Legenda:(CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).

Nota:Dados expressos como média \pm EPM. *P < 0,05.

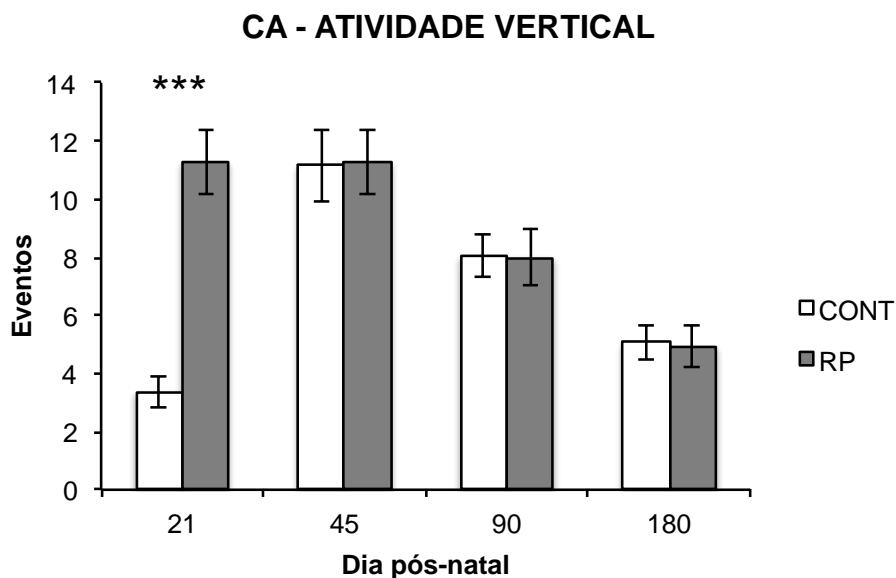


Figura 21- Números de eventos de atividade vertical no CA, segmentado por grupo e idade

Legenda: (CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).

Nota: Dados expressos como média ± EPM. ***P < 0,001.

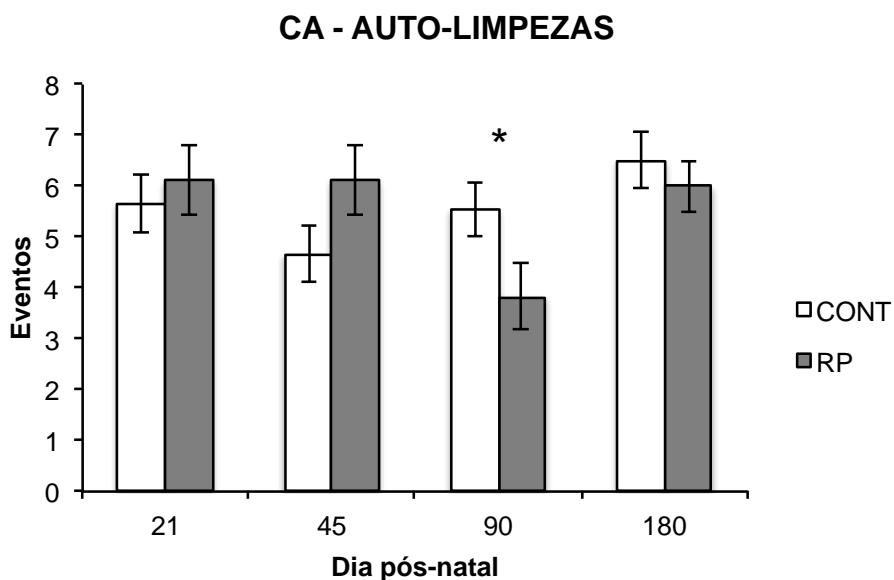


Figura 22- Números de eventos de auto-limpeza no CA, segmentado por grupo e idade

Legenda: (CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).

Nota: Dados expressos como média ± EPM. ***P < 0,05.

3.2.3 Teste do labirinto aquático de 8 braços

A ANOVA global do LAROB indicou uma interação DIA x IDADE ($F = 150,1$; $gl = 2,8$; $P < 0,001$) significativa. As análises seguintes foram feitas para cada idade separadamente.

Em todas as idades testadas, verificamos que a desnutrição materna durante a lactação não afetou o desempenho de memória e aprendizado, medido pela latência para encontrar a plataforma, durante os quatro primeiros dias de teste (em que a plataforma foi mantida na mesma posição – Figuras 23 a 26): tanto os animais do grupo CONT quanto os do grupo RP, independentemente da idade, apresentaram uma redução progressiva da latência ao longo dos dias ($P < 0,001$ em todas as análises).

No 5º dia de testes (probe trial), encontramos efeitos significativos da restrição protéica na latência nas idades de P21 ($F = 5,8$; $gl = 1$; $P < 0,05$) e em P180 ($F = 4,9$; $gl = 1$; $P < 0,05$), mostrando que a desnutrição materna durante a lactação, diminuiu a latência para encontrar a plataforma (Figura 27).

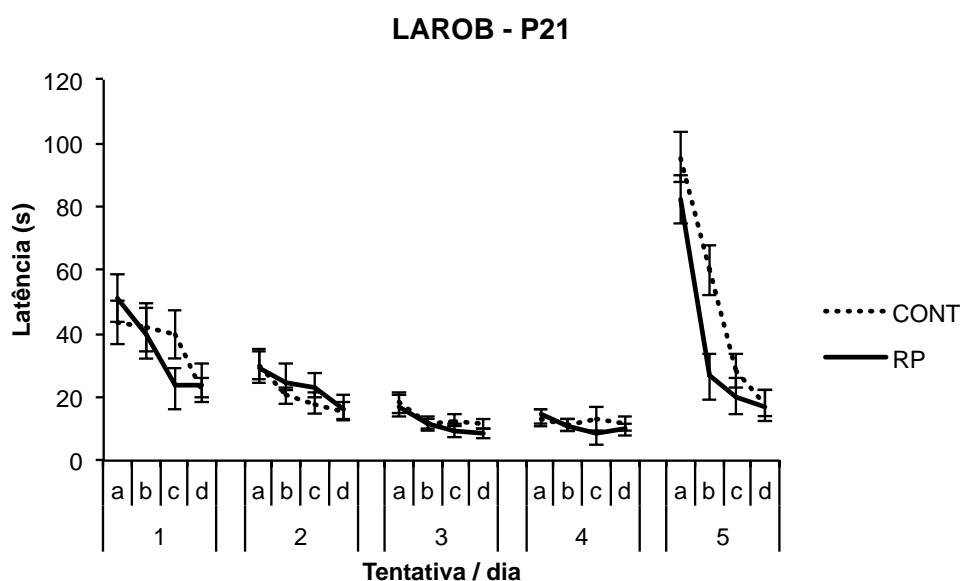


Figura 23- Latência para encontrar a plataforma no LAROB na idade de PN21, segmentado por grupo

Legenda: (CONT: $n = 18$; RP: $n = 18$, por idade).

Nota: Dados expressos como média \pm EPM.

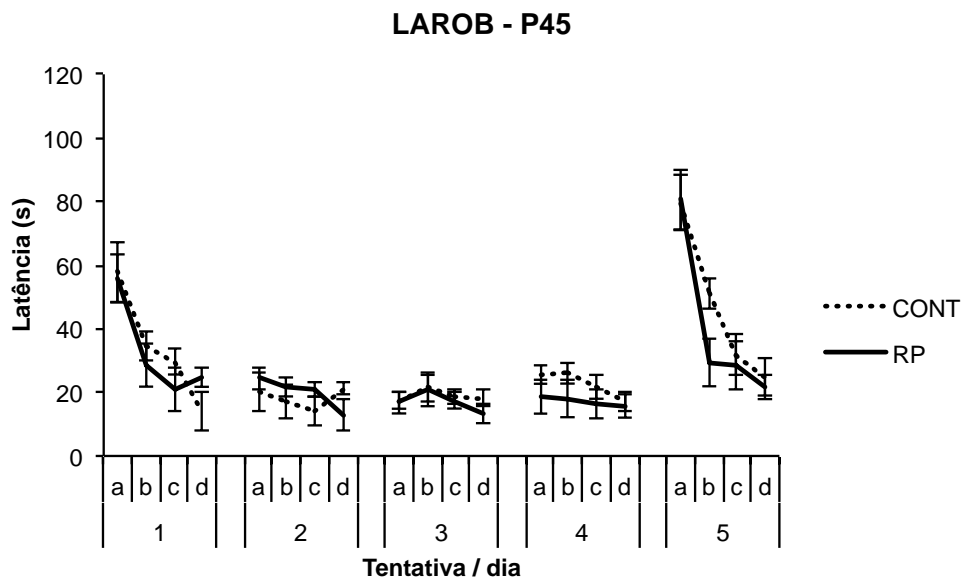


Figura 24- Latência para encontrar a plataforma no LAROB na idade de PN45, segmentado por grupo

Legenda: (CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).

Nota: Dados expressos como média \pm EPM.

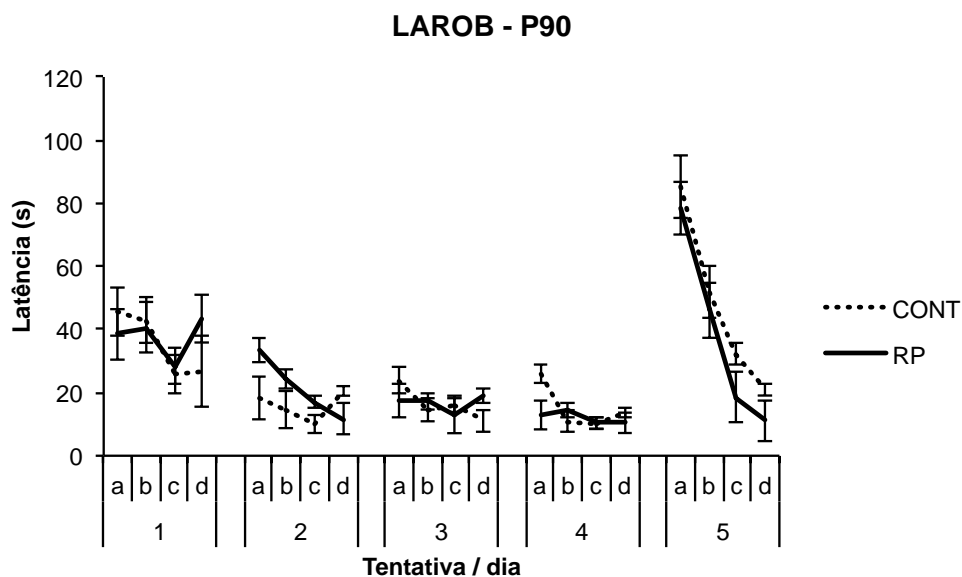


Figura 25- Latência para encontrar a plataforma no LAROB na idade de PN90, segmentado por grupo

Legenda: (CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).

Nota: Dados expressos como média \pm EPM.

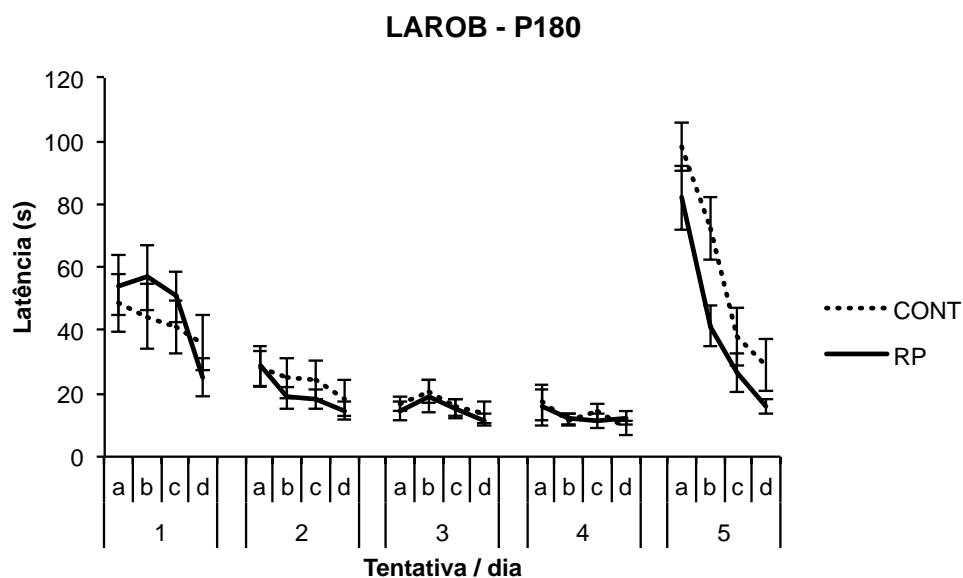


Figura 26- Latência para encontrar a plataforma no LAROB na idade de PN180, segmentado por grupo

Legenda:(CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).

Notas: Dados expressos como média \pm EPM.

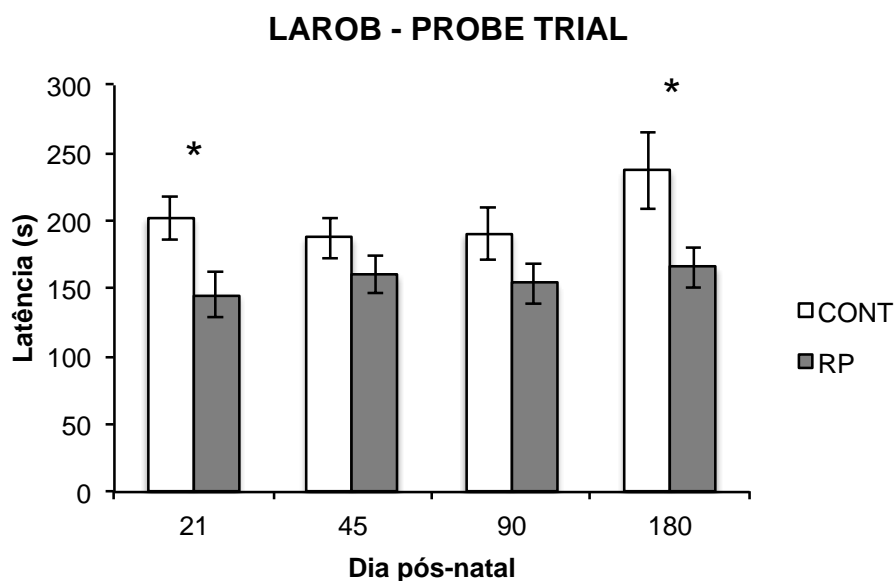


Figura 27- Latência para encontrar a plataforma no LAROB no probe trial, segmentado por grupo e idade

Legenda:(CONT: n = 18; RP: n = 18, por idade).

Nota: Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

3.3 Avaliação da função adrenal

3.3.1 Corticosterona sérica

Foi observada uma diferença significativa no perfil de corticosterona sérica ao longo das idades entre os grupos CONT e RP ($F = 3,6$; $gl = 3$; $P < 0,05$). Em P90 ($P < 0,01$) os animais do grupo RP apresentaram valores menores de corticosterona sérica do que o grupo CONT. Nas demais idades analisadas não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Figura 28).

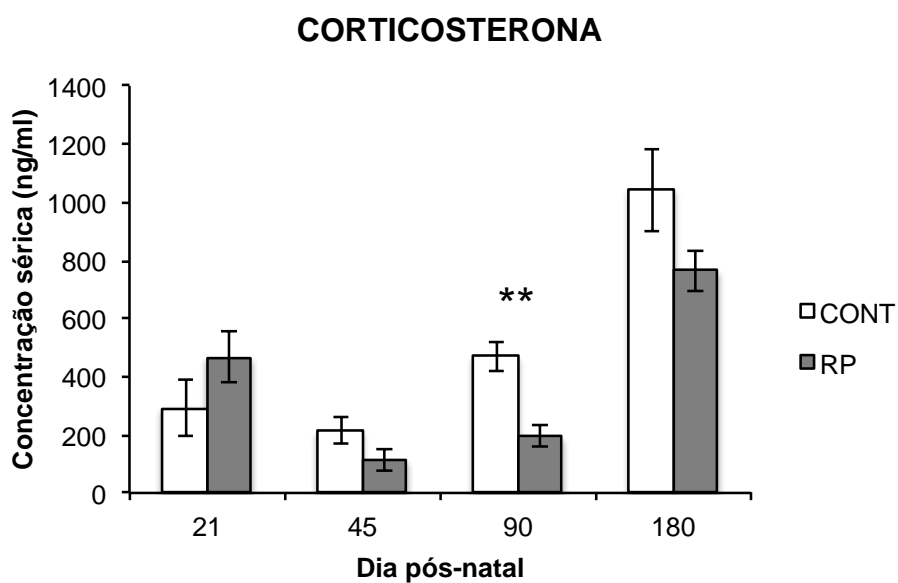


Figura 28- Conteúdo de corticosterona sérica, segmentado por grupo e idade
Legenda: (CONT: $n = 8$; RP: $n = 8$ por idade).
Nota: Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

3.3.2 Conteúdo de catecolaminas

Foi observada uma diferença significativa no perfil de catecolaminas totais ao longo das idades entre os grupos CONT e RP ($F = 5,1$; $gl = 3$; $P < 0,01$). Em P21 ($P < 0,05$) e P180 ($P < 0,05$) os animais grupo RP apresentaram valores mais elevados de catecolaminas totais do que o grupo CONT. Nas demais idades analisadas não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Figura 29).

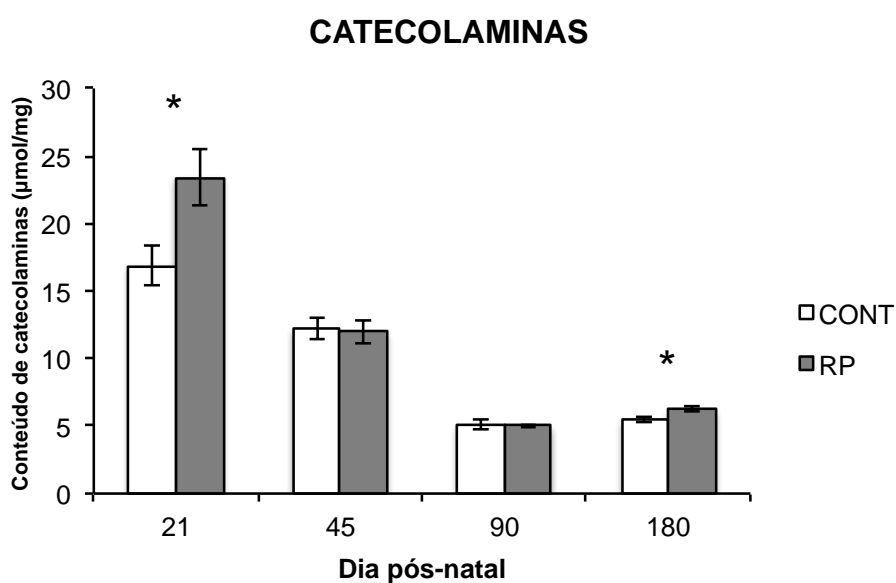


Figura 29- Conteúdo de catecolaminas totais, segmentado por grupo e idade
Legenda:(CONT: n = 8; RP: n = 8 por idade).

Nota: Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

4 DISCUSSÃO

A gestação em humanos é uma fase de mudanças metabólicas importantes, além disso, durante o terceiro trimestre da gestação ocorre o período conhecido como “surto de crescimento cerebral” (brain growth spurt), período em que há picos nos processos de mielinização, arborização dendrítica e sinaptogênese (Morgane et al., 1993). No entanto, o cérebro humano não desenvolve rapidamente apenas durante a gestação, mas também nos primeiros dois anos vida (Dobbing, 1968). Em um recém-nascido, a massa do cérebro equivale a 10% da sua massa corporal, enquanto que no adulto equivale somente a 2%. Isto mostra o quão rápido é o desenvolvimento cerebral durante esta fase inicial (Benton, 2008). Conseqüentemente, o período do desenvolvimento corresponde a uma fase de intensa necessidade energética, o que indica que a desnutrição materna pode acarretar diversos efeitos negativos, no feto e no recém-nascido, se este estiver dependendo principalmente ou exclusivamente do aleitamento materno para sua nutrição (Kaminetzky et al., 1973; Roeder; Chow, 1972; Winick, 1969; 1990; Winick et al, 1971).

O período de lactação é particularmente crítico para o desenvolvimento dos mamíferos, sendo que uma desnutrição neste momento causa, como mencionado anteriormente, alterações que podem perdurar a vida inteira do indivíduo mesmo se nutrição deste for normalizada. Além dos efeitos imediatos que podem se tornar permanentes, também é sabido que alterações nutricionais neste período podem levar ao surgimento, em médio e longo prazo, de alterações estruturais e funcionais pelo mecanismo da programação (Moura; Passos, 2005). Devido a isto, fatores nutricionais, como a restrição protéica, quando impostos as progenitoras nesta fase podem influenciar o desenvolvimento da prole. Em nosso trabalho, escolhemos investigar os efeitos comportamentais da desnutrição durante a lactação, pois sabemos que este período do desenvolvimento em roedores, do ponto de vista do sistema nervoso central, apresenta equivalências com o terceiro trimestre da gestação e com período de lactação em seres humanos (Clancy et al., 2007; Quinn, 2005).

No nosso estudo utilizamos o modelo de desnutrição protéica materna, sendo assim, se torna essencial entender um pouco das características associadas às progenitoras antes de discutirmos os resultados encontrados nas proles. Um aspecto importante é a quantidade e a qualidade do leite que as progenitoras desnutridas estão passando para a prole. De uma maneira geral, a análise da composição do leite mostram mudanças marcantes, durante a lactação, principalmente no período neonatal precoce (Keen,1981). Durante a amamentação, mudanças na composição do leite podem ocorrer e agir como sinais de saciedade (Hall, 1975). Essas alterações podem estabelecer um conjunto de pontos para o consumo de energia ou taxa metabólica durante a vida da prole.

Vários autores relataram que a restrição protéica pode alterar o volume e a composição do leite em ratos, o que também já foi avaliado pelo nosso grupo. Foi verificado que o leite de ratas lactantes submetidas à restrição protéica, apresenta menor concentração de proteínas e que, além disso, o volume de leite produzido também está reduzido pela desnutrição (Passos, 2000). É sabido que as ratas lactantes RP apresentam hipofagia, que é causada por uma combinação da hiperleptinemia e hipoprolactinemia (Lisboa, 2006). Consequentemente, essas mães transferem um leite deficiente em proteína e em volume para a prole. Em relação aos nutrientes do leite materno, não há diferença na concentração de lactose e de lipídeos, porém a concentração de proteínas é menor, assim como o seu valor calórico (Passos et al., 2000).

Durante a lactação, mecanismos diversos são ativados para suprir a grande necessidade de energia da progenitora, como hiperfagia, redução da taxa metabólica basal e fluxo de nutrientes com preferência para a lactogênese (Lisboa, 2006). Durante a gestação e lactação tem sido proposto, como indicado acima, que exista uma associação entre a prolactina (PRL) e a leptina (LEP) no controle da ingestão alimentar e do peso corporal da progenitora, onde a PRL exerce papel de estimuladora da ingestão alimentar e a LEP tem efeito anorexigênico. Neste período, estes hormônios possuem relação inversa, ou seja, enquanto a leptina está baixa, a prolactina está alta. Desta forma as alterações na ingestão alimentar e no peso corporal das mães RP lactantes podem ser explicados também por distúrbios hormonais presentes nestes animais.

Outro aspecto importante a ser levado em consideração é o nível de corticosterona sérica nas mães RP, que não apresentou alterações apesar da desnutrição ser considerada um estresse. A corticosteronemia é um dado importante, pois é uma medida indireta no nível de estresse dessas progenitoras. Altos níveis de corticosterona sérica, por exemplo, poderiam estar associados a prejuízos no cuidado parental, o que por si só acarretaria em diversos efeitos no comportamento da prole.

Após caracterizar alguns aspectos da lactação das progenitoras submetidas à restrição protéica e como essa restrição realizada nas progenitoras se projeta na prole, podemos então discutir os resultados encontrados nesses filhotes. Para uma melhor compreensão, discutiremos primeiramente resultados relacionados com o desenvolvimento somático e, em seguida, as alterações comportamentais e de função adrenal, separados por idade.

4.1 Massa corporal e consumo de ração

O modelo de desnutrição por restrição protéica durante o período de lactação está bem estabelecido em nossos laboratórios e os projetos desenvolvidos com este já resultaram em diversas publicações abordando aspectos somáticos, metabólicos e endócrinos. Dois aspectos observados em nossos resultados estão em acordo com os resultados previamente informados e corroboram a hipótese de que o modelo foi adequadamente implantado no presente estudo. As progenitoras RP apresentaram uma significativa e progressiva redução de peso ao longo da lactação quando comparadas às progenitoras controle e o consumo de ração das progenitoras RP permaneceu relativamente estável ao longo deste período ao passo que o consumo das progenitoras controle aumentou progressivamente. Essa hipofagia nas progenitoras RP, presente desde o primeiro dia de lactação, somada aos altos níveis de leptina, aos baixos níveis de prolactina e a necessidade de alimentar os filhotes resultaram em menor peso corporal dessas ratas lactantes já a

partir do oitavo dia da lactação. Essas condições das progenitoras RP levaram a produção de um leite com quantidade de proteína reduzida e em menor volume.

O desenvolvimento somático das proles RP refletiu a qualidade e a quantidade do leite produzido por suas progenitoras: estes filhotes, embora tenham nascido com o mesmo peso dos animais do grupo controle, apresentaram um padrão de crescimento de massa corporal bem menos acentuado do que o destes últimos ao longo de todo o experimento. É importante frisar que este déficit ponderal foi mantido até a idade adulta, em P180, mostrando que mesmo após o acesso a ração normoprotéica depois do desmame não foi possível, aos animais RP, uma recuperação integral do insulto original durante a lactação. Esses resultados estão em acordo com os dados anteriores dos nossos laboratórios (Passos et al., 2000; Teixeira et al., 2002; De Moura et al., 2007; Fagundes et al., 2007) e indicam que o modelo foi reproduzido com sucesso.

4.2 Comportamento e função adrenal

4.2.1 21º dia pós-natal (P21)

O primeiro teste que realizamos nas proles foi o labirinto em cruz elevado (LCE), que é amplamente utilizado para avaliação da ansiedade, por ser um teste econômico, rápido, de fácil desenho, além do fato de não requerer procedimentos de testes muito cansativos. O tempo passado no braço aberto do aparelho bem como o número de entradas nestes braços são utilizados como variáveis associadas ao comportamento de ansiedade (Hogg, 1996; Rodgers; Dalvi, 1997; Stead et al., 2006; Abreu-Villaça et al., 2008; Manhães et al., 2008; Fraga et al., 2009). O que observamos em P21 foi que os animais RP apresentavam valores maiores nestas variáveis do que os animais do grupo controle.

Os roedores, de forma geral, evitam as áreas abertas do labirinto, as quais se presumem sejam as mais aversivas, ou seja, ansiogênicas, e mostram preferência

pelas partes fechadas e protegidas pelas paredes do aparelho (Pellow et al., 1985; Marco et al., 2006). Sendo assim o fato da prole RP passar mais tempo e entrar mais vezes nos braços abertos do labirinto sugerem que estes animais estão exibindo um comportamento de menor ansiedade quando comparados aos controles. Nossos dados corroboram dados da literatura: a menor ansiedade nos animais desnutridos por longos períodos foi previamente descrita tanto para a desnutrição pré-natal (Almeida, 1996) quanto para a pós-natal (Almeida et al, 1991, 1993, Santucci et al., 1994). O resultado do presente experimento poderia ser interpretado como um aumento nos traços comportamentais associados à impulsividade, onde a desnutrição estaria levando a deficiências na inibição comportamental, resultando em aumento da exploração de braços abertos no labirinto. Essa hipótese é particularmente interessante porque a desnutrição causa alterações na estrutura (Cintra et al., 1990; Crrdoba et al., 1992), neurofisiologia (Austin et al., 1986) e neuroquímica (Blatt et al., 1994) da formação do hipocampo, que é uma estrutura importante na modulação da inibição do comportamento em mamíferos (Gray, 1982). Além disso, tem sido demonstrado que a desnutrição altera os sistemas gabaérgico serotoninérgico no hipocampo (Del et al., 2002). Assim, alterações do sistema gabaérgico hipocampal pode estar subjacente aos efeitos ansiolíticos observados nesses animais. Considerando-se que a maior impulsividade é uma característica de transtorno de deficit de atenção, que é encontrado em grande proporção de crianças desnutridas (Galler et al., 1990), o conhecimento dos mecanismos de uma possível ligação entre a desnutrição pós-natal e impulsividade, em animais de laboratório, pode ser de relevância à realização de estudos que investigam aspectos de desnutrição induzindo transtorno de déficit de atenção em crianças.

O segundo teste realizado foi o campo aberto (CA), que é primariamente utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais, podendo também ser utilizado para avaliar a ansiedade, não tendo, porém a sensibilidade e a especificidade do LCE. Em P21, não observamos grande mudanças em relação a atividade locomotora desses animais, ainda assim vale a pena ressaltar que a prole RP mostrou um aumento próximo a significância na locomoção na periferia e na locomoção total. Por outro lado, os parâmetros etológicos dos animais RP

mostraram um aumento significativo no número de eventos de atividade vertical, que também tem sido utilizado como medida de atividade motora. Apesar dos nossos resultados principais não terem sido significativos, alguns trabalhos mostram que a redução de ingestão de proteína durante o período de desenvolvimento do cérebro resulta em aumento da locomoção na idade adulta. Esse aumento da atividade locomotora também tem sido associado ao fato do hipocampo ser sensível ao estresse, contexto no qual pode ser inserido a desnutrição materna, levando a modificação das respostas comportamentais moduladas por ele, como a atividade locomotora (Gray; Mcnaughton, 1996; Bast; Feldon, 2003; Bannerman et al., 2004).

O terceiro teste realizado foi o labirinto aquático radial de oito braços (LARO), desenvolvido por Buresová et al., 1985 que é utilizado para avaliar aprendizado e memória. O teste baseia-se no fato de que roedores apresentam aversão à imersão em água (Filgueiras; Manhães, 2004, 2005), de modo que estes procuram sair da água o mais rápido possível utilizando-se de estratégias visuo-espaciais para localizar a plataforma de escape (Olton, 1987). Nos 4 primeiros dias de teste (quando a plataforma permanecia no mesmo lugar), não observamos diferenças significativas de desempenho entre os grupos. Observamos que ambos os grupos tiveram uma evolução na aprendizagem, caracterizado pela diminuição da latência para encontrar a plataforma ao longo desta primeira sequência do experimento. Porém no 5º dia de teste (probe trial - onde a plataforma era trocada de lugar), os animais desnutridos apresentaram uma menor latência, para encontrar a plataforma em relação ao grupo controle, o que sugere um melhor desempenho de memória e aprendizagem nesta idade. Esse fato é curioso, pois alguns estudos mostram que no labirinto aquático de Morris tanto os animais controles e os animais desnutridos aprenderam a tarefa de localização da plataforma, porém os animais desnutridos apresentam um tempo mais longo para efetuar a tarefa em relação ao controle (Valadares et al., 2010). Estes conflitos entre estudos podem ser atribuídos às diferenças de espécies animais, o tipo de desnutrição e a fase durante a qual foi aplicada, bem como o tipo de aprendizagem e memória espacial usado.

No labirinto aquático é possível criar diferentes procedimentos comportamentais, que permitem estudar alguns sistemas de memórias. Morris (1984) desenvolveu uma metodologia que permite utilizar duas formas de

navegação espacial. Uma das versões é chamada “pista proximal”, onde a plataforma é visível e o rato nada diretamente para esta pista proximal. Nesta versão, o animal não precisa estabelecer relações espaciais entre objetos; ele se orienta por esta pista específica, utilizando assim o “sistema de táxon”. A outra versão é chamada de “pista distal” e a plataforma fica submersa. Assim, o animal tem que utilizar pistas ambientais extra-labirinto para navegar até a plataforma. Na maioria dos trabalhos utilizando o labirinto aquático, a posição da plataforma permanece fixa em todo o experimento e deste modo se avalia um tipo de tarefa espacial específica, a memória espacial de referência. No entanto, o labirinto aquático também pode ser utilizado para avaliar a memória espacial operacional, na qual as informações são armazenadas por um tempo limitado em um contexto temporal específico (Kesner, 1986). Como nós só encontramos diferenças no probe trial é possível que, nesse caso, a desnutrição tenha afetado especificamente um tipo de memória, a memória espacial operacional, que é ativada quando a plataforma é trocada de lugar.

Quanto função adrenal, ao avaliarmos o conteúdo de catecolaminas totais na medula adrenal das proles na idade de P21, observamos um aumento no conteúdo de catecolaminas em relação ao controle. Podemos especular que nesta idade, logo após o insulto, os animais RP haviam acabado de ser expostos a uma situação de privação continuada. De fato, é importante ressaltar que a desnutrição, por si só, é um evento estressante. Sabe-se que o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é particularmente sensível a estímulos deste tipo agindo em períodos pré-natal e pós-natal (Young, 2002; Matthews, 2002). O sistema nervoso simpático e da medula adrenal, ou seja, o sistema simpatoadrenal (SAS), também é afetado por fatores nutricionais durante o desenvolvimento. As alterações na densidade da inervação simpática ou no estado funcional do nervo simpático e da medula adrenal em repouso ou em resposta a estressores específicos podem ser alterados por exposições fetal ou neonatal (Young, 2002).

Avaliamos a corticosteronemia sérica, porém não encontramos diferenças entre os grupos. Resultado esse que está em acordo com os de Fagundes et al. (2009), que demonstraram que ratos machos cujas progenitoras receberam dieta hipoprotéica na lactação não apresentam quaisquer alterações de corticosteronemia

em PN21 comparado ao controle. Esse resultado sugere que apesar da desnutrição ser um evento estressante, e esses animais terem sido testados logo após o insulto, estes não apresentam um comportamento estressado, como nós observamos no teste de ansiedade e no teste de atividade locomotora.

É interessante notar que a desnutrição materna afetou o conteúdo de catecolaminas e não afetou os níveis de corticosterona sérica. É importante levar em conta que o maior conteúdo de catecolaminas totais pode ser devido a duas possibilidades, um aumento de produção ou uma menor. Para entender melhor o que está acontecendo, seria necessária a quantificação do conteúdo de duas enzimas da via de biossíntese das catecolaminas por Western Blotting, a TH e a FMNT, análise que está neste momento em andamento. Em relação à corticosterona, é possível que a hiperleptinemia encontrada nesses animais (Passos, 2000) mantenha as concentrações de corticosterona sérica mais baixas.

4.2.2 45º dia pós-natal (P45)

Não observamos alterações nos padrões de comportamentos associados à ansiedade, no comportamento locomotor e no desempenho de memória e aprendizado visuo-espacial na prole RP no 45º dia de vida pós-natal. Também não encontramos alterações na concentração sérica de corticosterona e no conteúdo de catecolaminas totais nestes animais. É importante ressaltar que em P45, os ratos estão no período da adolescência. Este período de transição para a vida adulta é caracterizado por mudanças comportamentais e endócrinas. Por exemplo, o cérebro durante a adolescência apresenta continuada maturação de seus sistemas, com perda de aproximadamente metade do número de conexões sinápticas em algumas regiões neurais (Rakic et al., 1994), perda esta que pode servir para refinar as conexões e aumentar a eficiência cerebral durante este período (Chugani, 1996). Considerando-se que a adolescência é um período de transição e que os testes comportamentais foram realizados mais de 3 semanas após o término da restrição protéica, a inexistência de diferenças entre grupos pode estar relacionada, em

primeiro lugar, ao fato de que os animais, em P45, já tiveram tempo para se recuperar dos efeitos agudos (observados em P21) da restrição protéica, e que ainda não houve tempo para surgirem os efeitos tardios, mais diretamente associados ao fenômeno de programação.

4.2.3 90º dia pós-natal (P90)

Quando testamos os animais no LCE, não encontramos diferenças significativas em nenhuma das variáveis analisadas. Observamos apenas que o grupo RP apresentou uma tendência de passar mais tempo no centro do aparelho em relação ao grupo controle, comportamento este que tem sido interpretado como um comportamento relacionado com uma tomada de decisão.

Ao avaliarmos estes animais no campo aberto, observamos importantes alterações no comportamento da prole RP. Estes animais apresentaram uma diminuição no tempo no centro, quando comparado ao grupo controle. O tempo no centro no campo aberto, também pode ser utilizado como medida de ansiedade, sendo assim, a prole RP estaria manifestando um comportamento mais ansioso, por passar menos tempo no centro da caixa. Além disso, estes animais apresentaram uma diminuição significativa na locomoção total, sugerindo que a desnutrição materna afetou a atividade locomotora da prole. Nossos achados não corroboram dados na literatura, onde autores mostram que a redução da ingestão de proteínas, durante o período de desenvolvimento do cérebro, resulta em um aumento da locomoção da prole (Almeida et al., 1993; Trzctnska et al., 1992).

Em relação ao aprendizado e memória, não encontramos diferenças significativas entre grupos tanto no período inicial de quatro dias em que a plataforma era mantida na mesma posição quanto no probe trial: ambos os grupos aprenderam igualmente ao longo dos dias e tentativas.

Não encontramos diferenças significativas no conteúdo de catecolaminas adrenais. Porém, ao analisar os níveis de corticosterona sérica, observamos que a prole RP apresentava uma diminuição nos níveis séricos destes hormônios, que

pode estar relacionado com a diminuição da atividade locomotora, que nós detectamos no campo aberto.

4.2.4 180º dia pós-natal (P180)

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tanto nos comportamentos apresentados no LCE quanto no CA. Quando avaliamos as proles no LAROB, observamos que nos 4 primeiros dias de teste (quando a plataforma permanecia no mesmo lugar), não havia diferenças significativas entre os grupos na latência para encontrar a plataforma de escape. De fato, observamos que ambos os grupos tiveram uma evolução na aprendizagem, caracterizado pela diminuição da latência para encontrar a plataforma ao longo dos dias e das tentativas nesta fase do experimento. Porém, no 5º dia de teste, com a mudança na posição da plataforma para o probe-trial, os animais desnutridos apresentaram uma menor latência para encontrar a plataforma em relação ao grupo controle, o que sugere uma melhora na aprendizagem nesta idade.

Assim como em P21, nossos resultados divergem dos encontrados na literatura. Como nós só encontramos diferenças no probe trial, é possível que, nesse caso, a desnutrição tenha afetado especificamente um tipo de memória, a memória espacial operacional, que é ativada quando a plataforma é trocada de lugar. É possível que no presente estudo a alteração de rigidez comportamental dos animais desnutridos possa ter favorecido a realização da tarefa.

Ao avaliarmos o conteúdo de catecolaminas adrenais totais nas proles na idade de P180, nós observamos um aumento no grupo RP em relação ao controle. Esse resultado corrobora com os achados de Fagundes et al. (2009). Nesse trabalho foi avaliado também a secreção *in vitro* da secreção de catecolaminas na medula estimulada por cafeína e foi observado uma maior secreção destas pela prole RP adulta, podendo-se concluir que estes animais produzem e liberam mais catecolaminas.

Avaliamos ainda a corticosteronemia sérica, porém não encontramos diferenças entre os grupos. Esse resultado diverge do observado por Fagundes et al (2009). Estes demonstraram que, em P180, as proles RP apresentaram hipercorticosteronemia. É importante ressaltar que os animais utilizados no presente estudo podem ser fisiologicamente diferentes dos animais utilizados em outros trabalhos (Passos et al., 2000; Teixeira et al., 2002; De Moura et al., 2007; Fagundes et al., 2007) do nosso grupo pelo fato de que em nosso experimento, os animais passaram por uma bateria de testes comportamentais antes do sacrifício, o que poderia justificar as divergências de resultados encontrados.

4.3 Considerações finais

Muitos trabalhos vem sendo publicados estudando os efeitos de alguns tipos de desnutrição, principalmente a protéica, em diversos comportamentos. Porém, as alterações relatadas são quase sempre avaliadas na idade adulta. Tal fato não nos permite determinar se os efeitos comportamentais da desnutrição estão presentes desde o insulto original ou se estes surgem tardiamente, associados a mecanismos de programação. Também não nos é possível saber se os animais apresentaram alterações comportamentais durante ou após o insulto, mas que tiveram curta duração, não estando mais presentes na vida adulta. Em nosso trabalho, procuramos abordar esta lacuna do conhecimento através da análise comportamental da prole RP em diferentes pontos de seu desenvolvimento e maturação: no desmame (P21 – logo após o insulto), na adolescência (P45), na fase inicial da idade adulta (P90) e em uma fase mais madura da idade adulta (P180).

Considerando-se os comportamentos associados à ansiedade observados no LCE, nossos principais achados indicam que os animais RP apresentam-se menos ansiosos que os animais CONT somente logo após os desmame. Este padrão temporal sugere que os efeitos ansiolíticos da dieta RP são de surgimento rápido e têm um curto prazo de duração, estando o comportamento dos animais RP normalizado a partir da adolescência. É curioso notar, no entanto, que o tempo de

permanência no centro do CA, uma variável que também pode ser utilizada na análise dos comportamentos associados à ansiedade, apresenta um padrão temporal diverso. No CA foi observado um efeito ansiogênico nos animais RP somente quando adultos jovens. Esta alteração comportamental seria, então, de surgimento tardio, mas com normalização ao longo do amadurecimento do animal. Não está descartada a possibilidade de um efeito de programação no CA, mesmo que de curta duração. A diferença de resultados entre os testes comportamentais pode ser explicada pela existência de evidências de que não existem correlações significativas entre os testes e que, também entre estes testes, existem diferenças no carregamento de fatores em análises fatorais. Como resultado, foi sugerido que o LCE e o CA medem aspectos diferentes da ansiedade (Ramos, 2008); foi sugerido que o CA é tanto um modelo para a análise da ansiedade normal que todos enfrentamos quando confrontados com uma situação estressante e/ou ameaçadora como um modelo de transtorno de ansiedade generalizada, enquanto que foi sugerido o LCE seria um teste mais adequado para o pânico, embora mantendo-se como um teste também para o transtorno de ansiedade generalizada (PRUT; Belzung, 2003; Che, 2000).

A atividade locomotora avaliada no CA indicou uma alteração no deslocamento total dos animais como resultado da dieta RP apenas em adultos jovens (P90): os animais da prole cujas progenitoras passaram pela dieta hipoprotéica apresentaram uma significativa redução da atividade locomotora. Assim, para este comportamento, pode-se sugerir um efeito de programação, visto que a alteração comportamental é de surgimento tardio, embora com curta duração. Outro parâmetro comportamental utilizado em nosso trabalho que tem sido associado à atividade locomotora é o número de entradas no braço fechado do LCE. Ao contrário do que ocorreu no CA, não foram observadas diferenças significativas entre grupos ao longo do tempo para esta variável. Tal como mencionado para os dados de ansiedade, a natureza diversa dos dois testes comportamentais deve explicar a diferença nos resultados.

No que diz respeito ao desempenho de memória e aprendizado, verificamos que a melhora de desempenho ao longo das tentativas e dos dias quando se considera a primeira fase da avaliação (4 primeiros dias) é similar entre os grupos RP e CONT em todas as idades. Por outro lado, uma significativa diferença entre os

grupos, favorecendo o grupo RP foi notada no probe trial ao tempo do desmame e na vida adulta em P180. Este padrão de resultados sugere que estão presentes tanto efeitos agudos de curta duração quanto efeitos de longo prazo associados à programação.

É interessante notar que as alterações endócrinas observadas em nosso estudo parecem refletir algumas das alterações comportamentais. Por exemplo, os níveis de corticosterona sérica só estavam alterados (reduzidos) nos animais RP em P90, o que guarda uma boa relação com os achados de atividade locomotora e tempo no centro do campo aberto. Adicionalmente, o conteúdo de catecolaminas estava alterado (aumentado) especificamente em P21 e P180, guardando uma boa relação com os dados do probe trial no labirinto aquático radial. Embora as relações apresentadas acima sejam instigantes e aparentemente claras, o desenho experimental utilizado no presente estudo não permite o estabelecimento de uma relação de causa e efeito. Neste sentido, novos estudos serão necessários para elucidar as relações entre as alterações endócrinas e comportamentais no modelo de desnutrição protéica materna durante o período de lactação. Adicionalmente, é bem documentado que alterações comportamentais refletem alterações no funcionamento da circuitaria do sistema nervoso central. Porém, ainda não dispomos de informações sobre possíveis efeitos da RP sobre a atividade destes circuitos em diferentes pontos do desenvolvimento e maturação dos animais experimentais. Então, nossos próximos passos serão no sentido de aprofundar o nosso conhecimento sobre os efeitos da desnutrição materna por restrição protéica durante o período da lactação no sistema nervoso central, com foco na análise dos sistemas de neurotransmissão serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico.

5 CONCLUSÃO

Nossos dados indicam que os animais do grupo RP apresentaram redução dos padrões de comportamento associado à ansiedade no final do período de lactação, redução da atividade locomotora em adultos jovens e melhora do desempenho de memória e aprendizado no final da lactação e em animais adultos em fases mais maduras. Adicionalmente, os dados indicam que há uma associação entre alterações nos parâmetros comportamentais e endócrinos. Podemos concluir que a restrição protéica materna durante o período de lactação em ratos afeta o comportamento apresentado ao longo da vida e que o padrão temporal dos efeitos varia em função do comportamento estudado.

REFERÊNCIAS

- Abreu-Villaça Y, Nunes F, De Queiroz-Gomes F, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:599-610.
- Acuña K, Cruz T. Avaliação do estado nutricional de adultos e idosos e situação nutricional da população brasileira. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(3):345-61.
- Almeida SS, de Oliveira LM, Graeff FG. Decreased reactivity to anxiolytics caused by early protein malnutrition in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1990;36(4):997-1000.
- Almeida SS, de Oliveira LM, Graeff FG. Early life protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity to anxiolytics. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991;103(4):513-8.
- Almeida SS, Soares EG, Bichuette MZ, Graeff FG, de Oliveira LM. Effects of early postnatal malnutrition and chlordiazepoxide on experimental aversive situations. *Physiol Behav*. 1992;51(6):1195-9.
- Almeida SS, Garcia RA, De Oliveira LM. Effects of early protein malnutrition on repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. *Physiol Behav*. 1993;54(4):749-52.
- Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996;20(3):389-402.
- Austin KB, Bronzino JD, Morgane PJ. Prenatal protein malnutrition affects synaptic potentiation in the dentate gyrus of rats in adulthood. *Dev Brain Res*. 1986;29:267-73.
- Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(33):14108-13.
- Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, et al. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004;28(3):273-83.

Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995;311(6998):171-4.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol*. 2003;18(8):733-6.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr*. 2004;23(6 Suppl):588S-95S.

Barker DJ. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest*. 1995;25:457-63.

Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med*. 2007;261(5):412-7.

Bast T, Feldon J. Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog Neurobiol*, 2003;70(4):319-45.

Batista Filho M, Rissin A. Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends. *Cad Saúde Pública*. 2003;19(Suppl 1):S181-91.

Bayne K. Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. *Am Physiol Soc Physiol*. 1996;39(4):208-11.

Benton D, ILSI Europe a.i.s.b.l. The influence of children's diet on their cognition and behavior. *Eur J Nutr*. 2008;47(Suppl 3):25-37.

Bhatnagar S, Lee TM, Vining C. Prenatal stress differentially affects habituation of corticosterone responses to repeated stress in adult male and female rats. *Horm Behav*. 2005;47(4):430-8.

Blatt GJ, Chen J, Rosene DL, Volicer L, Galler JR. Prenatal protein malnutrition effects on the serotonergic system in the hippocampal formation: An immunocytochemical, ligand binding, and neurochemical study. *Brain Res Bull*. 1994;34:507-18.

Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MC, Pazos-Moura CC, Reis AM, Moura EG. Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. *Horm Metab Res*. 2005;37:220-5.

Brioni JD, Cordoba N, Orsingher OA. Decreased reactivity to the anticonflict effect of diazepam in perinatally undernourished rats. *Behav Brain Res.* 1989;34(1-2):159-62.

Brioni JD, Orsingher OA. Operant behavior and reactivity to the anticonflict effect of diazepam in perinatally undernourished rats. *Physiol Behav.* 1988;44(2):193-8.

Brown AS, Cohen P, Greenwald S, Susser E. Nonaffective psychosis after prenatal exposure to rubella. *Am J Psychiatry.* 2000;157(3):438-43.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 29(8):1193-205.

Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res.* 2002;134(1-2):49-57.

Charney DS, Bremner JD. The neurobiology of anxiety disorders. In: Charney DS, Nestler EJ, Bunney BS, editors. *The Neurobiology of Mental Illness.* New York: Oxford University Press, 1999; p. 494-517.

Chavez A, Martinez C, Yaschine T. Nutrition, behavioral development, and mother-child interaction in young rural children. *1975;34(7):1574-82.*

Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001;25:235-60.

Chugani HT. Neuroimaging of developmental nonlinearity and developmental pathologies. In: Thatcher RW, Lyon GR, Rumsey j, Krasnegor N, editors. *Developmental Neuroimaging: mapping the development of brain and behavior.* San Diego: Academic Press, 1996; pp 187-95.

Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, Cuppini R, Ambrogini P, Santi S, Benedetti S, Del Grande P, Papa S. Neural precursor proliferation and newborn cell survival in the adult rat dentate gyrus are affected by vitamin E deficiency. *Neurosci Res.* 2002;44(4):369-77.

Cintra L, Diaz-Cintra S, Galvan A, Kemper T, Morgane PJ. Effects of protein malnutrition on the dentate gyrus in rats of three ages groups. *Brain Res.* 1990;532:171-277.

Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*. 2007;28:931-7.

Crnic LS. Models of infantile malnutrition in rats: effects on maternal behavior. *Dev Psychobiol*. 1980;13(6):615-28.

Crrdoba NE, Cuarda GR, Brioni JD, Orsinger OA. Perinatal protein deprivation enhances the anticonflict effect measured after chronic ethanol administration in adult rats. *J Nutr*. 1992;122:1536-41.

De Moura EG, Lisboa PC, Custódio CM, Nunes MT, de Picoli Souza K, Passos MC. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem*. 2007;18(2):134-9.

De Moura EG, Lisboa PC, Passos MC. Neonatal programming of neuroimmunomodulation--role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation*. 2008;15(3):176-88.

De Moura EG, Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep*. 2005;25(3-4):251-69.

De Onis M, Blössner M, Borghi E, Frongillo EA, Morris R. Estimates of Global Prevalence of Childhood Underweight in 1990 and 2015. *J Am Med Assoc*. 2004;291(21):2600-6.

Debassio WA, Kemper TL, Tonkiss J, Galler JR. Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res Bull*. 1996;41(6):379-83.

Del Angel-Meza AR, Ramirez-Cortes L, Adame-Gonzalez IG, Gonzalez Burgos I, Beas-Zarate C. Cerebral GABA release and GAD activity in protein- and tryptophan-restricted rats during development. *Int J Dev Neurosci*. 2002;20(1):47-54.

Díaz-Cintra S, Cintra L, Galván A, Aguilar A, Kemper T, Morgane PJ. Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J Comp Neurol*. 1991;310(3):356-64.

Dickerson JW, Dobbing J. Some peculiarities of cerebellar growth in pigs. *Proc R Soc Med*. 1966;59:1088.

Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev.* 1979;3(1):79-83.

Dobbing J. The influence of early nutrition on the development and myelination of the brain. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1964;159:503-9.

Dorner G, Plagemann A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res.* 1994;26:216-21.

Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trevenzoli IH, Garcia RM, Lisboa PC. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr.* 2007;98:922-8.

Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Santos-Silva AP, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Casimiro-Lopes G, Nogueira-Neto JF, Lisboa PC. Temporal evaluation of body composition, glucose homeostasis and lipid profile of male rats programmed by maternal protein restriction during lactation. *Horm Metab Res.* 2009;41(12):866-73.

Fall C. Maternal nutrition: effects on health in the next generation. *Indian J Med Res.* 2009;130(5):593-9.

Filgueiras CC, Manhães AC. Effects of callosal agenesis on rotational side preference of BALB/cCF mice in the free swimming test. *Behav Brain Res.* 2004;155(1):13-25.

Filgueiras CC, Manhães AC. Increased lateralization in rotational side preference in male mice rendered acallosal by prenatal gamma irradiation. *Behav Brain Res.* 2005;162(2):289-98.

Fishbeck KL, Rasmussen KM. Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *J Nutrition.* 1987;117:1967-75.

Fraga-Marques MC, Moura EG, Claudio-Neto S, Trevenzoli IH, Toste FP, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Neonatal hyperleptinaemia programmes anxiety-like and novelty seeking behaviours but not memory/learning in adult rats. *Horm Behav.* 2009;55(2):272-9.

Fraga-Marques MC, Moura EG, Silva JO, Claudio-Neto S, Pereira-Toste F, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Effects of maternal hyperleptinaemia during lactation on short-term memory/learning, anxiety-like and novelty-seeking behavioral traits of adult male rats. *Behav Brain Res.* 2010;206(1):147-50.

Françolin-Silva AL, da Silva Hernandez A, Fukuda MT, Valadares CT, Almeida SS. Anxiolytic-like effects of short-term postnatal protein malnutrition in the elevated plus-maze test. *Behav Brain Res.* 2006;173(2):310-4.

Franková S. Effect of protein-calorie malnutrition on the development of social behavior in rats. *Dev Psychobiol.* 1973;6(1):33-43.

Fukuda MT, Françolin-Silva AL, Almeida SS. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. *Behav Brain Res.* 2002;133(2):271-7.

Galler JR, Ramsey FC, Morley DS, Archer E, Salt P. The long-term effects of early kwashiorkor compared with marasmus. IV. Performance on the national high school entrance examination. *Pediatr Res.* 1990;28:235-9.

Gao H, Yallampalli U, Yallampalli C. Gestational Protein Restriction Reduces Expression of Hsd17b2 in Rat Placental Labyrinth. *Biol Reprod.* 2012 [Epub ahead of print].

Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol.* 2007;19(1):1-19.

Gluckman PD, Hanson MA, Pinal C. The developmental origins of adult disease. *Matern Child Nutr.* 2005;1(3):130-41.

Godfrey KM, Robinson S. Maternal nutrition, placental growth and fetal programming. *Proc Nutr Soc.* 1988;57:105-11.

Goodlett CR, Horn KH. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res Health.* 2001;25(3):175-84.

Goodlett CR, Horn KH, Zhou FC. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005;230(6):394-406.

Gray JA. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. Oxford: Oxford University Press; 1982.

Gray JA, McNaughton N. The neuropsychology of anxiety: reprise. *Nebr Symp Motiv.* 1996;43:61-134.

Gurmini J, Cecílio WAC, Schuler SL, Olandoski M, Noronha L. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. *Bras Patol Med Lab.* 2005;41(4):271-8.

Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992;35(7):595-601.

Hall B. Activation of human milk lipase. *Biochem Soc Trans.* 1975;3(1):90-1.

Hall CS. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 1934;18:385-403.

Hernandes AS, Almeida SS. Postnatal protein malnutrition affects inhibitory avoidance and risk assessment behaviors in two models of anxiety in rats. *Nutr Neurosci.* 2003;6(4):213-9.

Hirsh R. The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. *Behav Biol.* 1974;12(4):421-44.

Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;54:21-30.

Jahnke S, Bedi KS. Undernutrition during early life increases the level of apoptosis in the dentate gyrus but not in the CA2+CA3 region of the hippocampal formation. *Brain Res.* 2007;1143:60-9.

Kar, BR, Rao, SL, Chandramouli, BA. Cognitive development in children with chronic protein energy malnutrition. *Behav Brain Funct.* 2008;4:31.

Keen CL, Lönnerdal B, Clegg M, Hurley LS. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *J Nutr.* 1981;111(2):226-36.

Keselman HJ, Rogan JC. Repeated measures F tests and psychophysiological research: controlling the number of false positives. *Psychophysiology*. 1980;17(5):499-503.

Kesner RP, Crutcher KA, Measom MO. Medial septal and nucleus basalis magnocellularis lesions produce order memory deficits in rats which mimic symptomatology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1986;7(4):287-95.

Laino, CH, Cordoba, NE, Orsingher, OA. Perinatally protein-deprived rats and reactivity to anxiolytic drugs in the plus-maze test: an animal model for screening antipanic agents? *Pharmacol Biochem Behav*. 1993;46(1):89-94.

Laus MF, Vales LD, Costa TM, Almeida SS. Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;8(2):590-612.

Levin HS, Grossman RG, Kelly PJ. Short-term recognition memory in relation to severity of head injury. *Cortex*. 1976;12(2):175-82.

Levitsky DA, Strupp BJ. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J Nutr*. 1995;125(8 Suppl):2212S-220S.

Lisboa PC, Passos MCF, Dutra SCP, Bonomo LT, Denolato ATA, Reis AM, Moura EG. Leptin and Prolactin, but not Corticosterone, Modulate Body Weight and Thyroid Function in Protein- malnourished Lactating Rats. *Horm Metab Res*. 2006;38:1-5.

Lucas A, Stafford M, Morley R, Abbott R, Stephenson T, MacFadyen U, Elias-Jones A, Clements H. Efficacy and safety of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of infant-formula milk: a randomised trial. *Lancet*. 1999;354:1948-54.

Manhães AC, Guthierrez MCS, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res*. 2008;193(2):216-24.

Mansur SS, Neto FR. Desenvolvimento neuropsicomotor de lactentes desnutridos *Rev Bras Fisioter*. 2006;10(2):185-91.

Mantzoros CS, Varvarigou A, Kaklamani VG, Beratis NG, Flier JS. Effects of birth weight and maternal smoking on cord blood leptin concentrations of full-term and preterm newborn. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(9): 2856-61.

Marco EM, Llorente R, Moreno E, Biscaia JM, Guaza C, Viveros MP. Adolescent exposure to nicotine modifies acute functional responses to cannabinoid agonists in rats. *Behav Brain Res.* 2006;172:46-53.

Matthews SG. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13:373-80.

Milman A, Frongillo, EA, de Onis M, Hwang JY. Differential Improvement among Countries in Child Stunting Is Associated with Long-Term Development and Specific Interventions *J Nutr.* 2005;135:1415-22.

Moreira-Camargo LM, de Sousa-Almeida S. Early postnatal protein malnutrition changes the development of social play in rats. *Physiol Behav.* 2005;85(3):246-51.

Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993;17(1):91-128.

Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984;11(1):47-60.

Moura EG, Passos MCF. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep.* 2005;25(3-4):251-69.

Neugebauer R, Hoek HW, Susser E. Prenatal exposure to wartime famine and development of antisocial personality disorder in early adulthood. *JAMA.* 1999;282(5):455-62.

Nunes-Freitas AL, Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Dutra-Tavares AC, Manhães AC, Lisboa PC, et al. Nicotine Exposure during the Third Trimester Equivalent of Human Gestation: Time Course of Effects on the Central Cholinergic System of Rats. *Toxicol Sci.* 2011;123:144-54.

Ohishi T, Wang L, Akane H, Shiraki A, Sato A, Uematsu M et al. Adolescent hyperactivity of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation periods in rats. *J Toxicol Sci.* 2012;37(2):345-52.

O'Keefe, J. A computational theory of the hippocampal cognitive map. *Prog. Brain Res.* 1990;301-12.

Oliveira E, Moura EG, Santos-Silva AP, Fagundes AT, Rios AS, Abreu-Villaça Y et al. Short- and long-term effects of maternal nicotine exposure during lactation on body adiposity, lipid profile, and thyroid function of rat offspring. *J Endocrinol.* 2009;3:397-405.

Olton DS. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiol Behav.* 1987;40(6):793-7.

Olton DS, Walker JA, Gage FH. Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Res.* 1978;2:295-308.

Organização Pan-Americana da Saúde. Informativo da Organização Pan-Americana da Saúde sobre desnutrição e má nutrição. Brasília; 2000.

Passos MC, Vicente LL, Lisboa PC, de Moura EG. Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult rats whose mothers weremalnourished during lactation. *Horm Metab Res.* 2004;36(9):625-9.

Passos, MCF; Ramos, CF; Moura, EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res.* 2000;1603-12.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985;14(3):149-67.

Pollitt E, Gorman KS, Engle PL, Martorell R, Rivera J. Early supplementary feeding and cognition: effects over two decades. Department of Pediatrics, School of Medicine, Cornell University. *Monogr Soc Res Child Dev.* 1993;58(7):1-99.

Pracyck JB, Seidler FJ, Miccook EC, Slotkin TA. Pitutary-thyroid axis reactivity to hyper- and hypothyroidism in the perinatal period: ontogeny of regulation and long term programming of responses. *J Devel Physiol.* 1992;18:105-9.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1-3):3-33.

Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition.* 2005;21:775-7.

Rakic P, Bourgeois JP, Goldman-Rakic PS, Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. *Progress Brain Research*. 1994;102:227-43.

Ramadan WS, Alshiraihi I, Al-Karim S. Effect of maternal low protein diet during pregnancy on the fetal liver of rats. *Ann Anat*. 2012. [Epub ahead of print].

Randt CT, Derby BM. Behavioral and brain correlations in early life nutritional deprivation. *Arch Neurol*. 1973;28(3):167-72.

Reyes-Castro LA, Rodriguez JS, Rodríguez-González GL, Chavira R, Bautista CJ, McDonald TJ et al. Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behav Brain Res*. 2012;227(2):324-9.

Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997; 21(6):801-10.

Romani SAM, Lira PIC. Fatores determinantes do crescimento infantil. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2004;4(1):15-23.

Rotta LN, Schmidt AP, Mello e Souza T, Nogueira CW, Souza KB, Izquierdo IA et al. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem Res*. 2003;28(8):1181-6.

Sala-Roca J, Martí-Carbonell MA, Garau A, Darbra S, Balada F. Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;72(3):643-50.

Santos-Silva AP, Lisboa PC, Pinheiro CR, Maia LA, Peixoto-Silva N, Abreu-Villaça Y, Moura EG, Oliveira E. Maternal tobacco smoke exposure during lactation inhibits catecholamine production by adrenal medullae in adult rat offspring. *Horm Metab Res*. 2012;44(7):550-4.

Santucci LB, Daud MM, Almeida SS, De Oliveira LM. Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994;49(2):393-8.

Save The Children. A life free from hunger: tackling child malnutrition. London, UK, 2012.

Scrimshaw NS. Malnutrition, learning and behavior. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1968;65(3):197-209.

Sigulem DM, Devincenzi MU, Lessa AC. Diagnosis of child and adolescent nutritional status. *J Pediatr.* 2000;76(Suppl 3):S275-84.

Smart JL. Malnutrition, learning and behavior': 25 years on from the MIT symposium. *Proc Nutr Soc.* 1993;52(1):189-99

Smart JL, Preece J. Maternal behavior of undernourished mother rats. *Anim Behav.* 1973;21(3):613-9.

St Clair D, Xu M, Wang P, Yu Y, Fang Y, Zhang F et al. Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959-1961. *JAMA.* 2005;294(5):557-62.

Stanwood GD, Levitt P. Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(1):65-71.

Stead J D, Clinton S, Neal C, Schneider J, Jama A, Miller S, et al. Selective breeding for divergence in novelty-seeking traits: Heritability and enrichment in spontaneous anxiety-related behaviors. *Behavior Genetics.* 2006;36:697-712.

Steiger JL, Alexander MJ, Galler JR, Farb DH, Russek SJ. Effects of prenatal malnutrition on GABAA receptor alpha1, alpha3 and beta2 mRNA levels. *Neuroreport.* 2003;14(13):1731-5.

Steiger JL, Galler JR, Farb DH, Russek SJ. Prenatal protein malnutrition reduces beta(2), beta(3) and gamma(2L) GABA(A) receptor subunit mRNAs in the adult septum. *Eur J Pharmacol.* 2002;446(1-3):201-2.

Stone, ME, Grimes, BS, Katz, DB. Hippocampal inactivation enhances taste learning. *Learn Mem.* 2005;12(6):579-86.

Strupp BJ, Levitsky DA. Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. *J Nutr.* 1995;125(8 Suppl):2221S-32S.

Susser E, Neugebauer R, Hoek HW, Brown AS, Lin S, Labovitz D, Gorman JM. Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch Gen Psychiatry*. 1996;53(1):25-31.

Teixeira CV, Passos MCF, Ramos CF, Dutra SCP, Moura EG. Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *J Nutr Biochem*. 2002;13:493-8.

Thomazinho, MCPS; Sícoli, JL; Silva, KWVF. Um panorama da desnutrição no Brasil nas últimas quatro décadas. 2012.

Trevenzoli, IH; Valle, MMR; Machado, FB; Garcia, RMG; Passos, MCF; Lisboa, PC; Moura, EG. Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J Physiol*. 2007;580:629-37.

Trzctńska M, Tonkiss J, Galler JR. Influence of prenatal protein malnutrition on behavioral reactivity to stress in adult rats. *Stress*. 1999;3(1):71-83.

Udani, PM. Protein energy malnutrition (PEM), brain and various facets of child development. *Indian J Pediatr*. 1992;59(2),165-86.

Valadares CT, Fukuda MT, Françolin-Silva AL, Hernandez AS, Almeida SS. Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. *Nutr Neurosci*. 2010;13(6):274-82.

Valdomero A, Bussolino DF, Orsingher OA, Cuadra GR. Perinatal protein malnutrition enhances rewarding cocaine properties in adult rats. *Neuroscience*. 2006;137(1):221-9.

Valdomero A, Velazquez EE, de Olmos S, de Olmos JS, Orsingher OA, Cuadra GR. Increased rewarding properties of morphine in perinatally protein-malnourished rats. *Neuroscience*. 2007;150(2):449-58.

Vicente, LL, de Moura, EG, Lisboa, PC, Monte Alto Costa, A, Amadeu, T, Mandarim-de-Lacerda, CA et al. Malnutrition during lactation in rats is associated with higher expression of leptin receptor in the pituitary of adult offspring. *Nutrition*. 2004;20(10):924-8.

Victoria CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, Richter L et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet*. 2008;371(9609):340-57.

Walker JE, Courtin F. Transient neonatal hyperthyroidism results in hypothyroidism in the adult rat. *Endocrinol.* 1985;116:2246-50.

Wang B, Brand-Miller J. The role and potential of sialic acid in human nutrition. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57(11):1351-69.

Warren MA, Bedi KS. The effects of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the granule-to-Purkinje cell ratio in the rat cerebellum. *J Anat.* 1988;159:147-53.

Whishaw IQ, Gharbawie OA, Clark BJ, Lehmann H. The exploratory behavior of rats in an open environment optimizes security. *Behav Brain Res.* 2006;171:230-9.

Wiggins RC, Fuller G, Enna SJ. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. *Life Sci.* 1984;35(21):2085-94.

Winick M. Malnutrition and brain development. *J Pediatr.* 1969;74(5):667-79.

Winick M. Nutrition and pregnancy. *Pediatr Ann.* 1990;19(4):235-7, 241-2.

Winick M, Noble A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr.* 1966;89(3):300-6.

Winick M, Rosso P, Brasel JA. Malnutrition and cellular growth in the brain: existence of critical periods. In: lipids, malnutrition and the developing brain. *Ciba Found Symp.* 1971;199-212.

Xavier GF. Dentate gyrus-selective alchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus.* 1999;9:668-81.

Young JB. Programming of sympathoadrenal function. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13:381-5.