**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

CAROLINE COSTA GOMES ALENCAR

**Efeitos da Desnutrição Proteica na Percepção de
Contraste e Acuidade Visual em Humanos e em Ratos**

(Obra de Abelardo da Hora)

São Paulo

-2014-

CAROLINE COSTA GOMES ALENCAR

**Efeitos da Desnutrição Proteica na Percepção de
Contraste e Acuidade Visual em Humanos e em Ratos**

(Versão Original)

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo como requisito para a
obtenção do título de Doutor em Neurociências e
Comportamento

Orientador: Luiz Roberto Giorgetti de Britto

Co-Orientador: Sebastião de Sousa Almeida

São Paulo

-2014-

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Alencar, Caroline Costa Gomes.

Efeitos da desnutrição proteica na percepção de contraste e acuidade visual em humanos e em ratos / Caroline Costa Gomes Alencar; orientador Luiz Roberto Giorgetti de Britto. -- São Paulo, 2014.

90 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Desnutrição 2. Acuidade visual 3. Sensibilidade ao contraste 4. Psicofísica I. Título.

RC623

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha esposa, meu amor, minha família, minha parceira, minha melhor amiga, Grasielle Dias Alencar. Obrigada por ter andado cada passo desse doutorado ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Adriana Marcolino, por todos os ensinamentos que me fizeram ser quem sou hoje. Pela segurança de saber que sempre posso contar contigo e que farás tudo pela minha felicidade! Te amo imensamente.

Ao meu irmão, o pastor Antônio Alencar, por ser um irmão tão maravilhoso, carinhoso, bondoso, agradável, companheiro e por, apesar das diferenças religiosas e da minha sexualidade, continuar me amando e sendo um exemplo pra mim.

À minha irmã, Rafaela Alencar, por ser minha irmãzinha linda, divertidíssima e além de super inteligente e competente.

À minha cunhada, Gerlândia Alencar, por cuidar tão bem do meu irmão pra mim e fazê-lo tão feliz!

À minha avó, Evanice, por toda ajuda e apoio na minha educação e pelo financiamento dos meus 6 anos de inglês. I love you grandma!

Aos meus tios Augusto Gomes e Susan Albuquerque, e seus filhos, Camila e Bruno, por serem tão presentes, carinhosos, atenciosos e caridosos comigo.

À minha tia Luciana Marcolino, por todo cuidado e carinho de sempre.

À minha tia Liana Marcolino, pela ajuda junto à Secretaria de Saúde.

Ao meu tio Aurélio Marcolino, por mesmo sendo tão ocupado, ter criado imagens e animações do equipamento aqui desenvolvido.

A minha tia Zélia Alencar, por ter me proporcionado uma ótima educação no melhor colégio de João Pessoa, Colégio Pio XI Bessa.

À minha tia “Tana”, Ana Maria Alencar, por ter sido minha família em São Paulo e por ter me ajudado emocional e financeiramente nesses 4 anos de doutorado.

À minha sogra, Maria Dias da Costa, pelo cuidado, carinho, mimos e comidas maravilhosas.

Ao meu sogro, Ramiro da Costa, por toda gentileza, educação, simpatia e pelas inúmeras caronas.

Às minhas cunhadas Gisele Dias e Elaine Dias, e ao meu cunhado Renato, por todo o carinho, apoio e aceitação na família.

Aos meus sobrinhos, Jhade Dias e Cauã Dias, por serem meus primeiros sobrinhos e os pentelhos mais amados da tia.

Ao Prof. Dr. Britto, ou como é mais conhecido pelos alunos e ex-alunos, “o chefe”, por toda ajuda ao longo desses anos, parceria, paciência e atenção. Um dia quero ser igual a você!

À Prof^a. Dra. Marina Sorrentino, por todo apoio pessoal e profissional, por ter dividido comigo os meus problemas e ajudado a encontrar soluções. Você além de uma grande amiga foi um anjo e um grande presente na minha vida!

À Prof^a. Dra. Kallene Vidal, por ter sido minha primeira amiga em São Paulo, pelos “passeios” ao banco, almoços e sorrisos, o fato é que tudo com você é divertido, até os momentos mais difíceis. Quero sua amizade pra sempre!

À Prof^a. Dra. Gabriela Chaves Kirsten, pela companhia sempre agradável e por saber que posso contar com você!

Ao Prof. Dr. Mauro Leonel, por toda Inteligência, simpatia e humildade.

Ao Adilson, por cuidar do chefe, do Laboratório e de todos tão bem e de forma tão divertida.

A todos os demais do Laboratório de Neurobiologia Celular da USP, em especial às Professoras Doutoras. Taisa Santos, Ana Ferreira, Caroline Real, Érica Kinjo, Vivian Guedes, Rafaela Pestana, Rosana Pagano e Marúcia Chacur.

À Universidade de São Paulo (USP – Capital), pela estrutura e apoio fornecidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro indispensável.

Ao setor de Inovação da USP, pela parceria e incentivo no desenvolvimento do Labirinto de Imagens.

Ao Prof. Dr. Sebastião Almeida pela co-orientação, e os membros do Laboratório de Nutrição e Comportamento (USP – Ribeirão Preto), por todo ensinamento em desnutrição.

Ao Prof. Dr. Natanael Antonio dos Santos pela parceria desde a Iniciação Científica, e os membros do Laboratório de Percepção, Neurociências e Comportamento (Universidade Federal da Paraíba), em especial as Professoras Doutoras Renata Toscano e Aline Lacerda, por toda base em pesquisa experimental.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curvas de desenvolvimento do cérebro de ratos e humanos (Dobbing, 1981).	4
Figura 2: Exemplos de um estímulo neutro e estímulos de teste, em coordenadas cartesianas e polar, respectivamente, calibrados para serem vistos a uma distância de 150 cm.	17
Figura 3: Função de Sensibilidade ao Contraste (FSC) para estímulos em coordenadas cartesianas, em crianças sem desnutrição (GC --●--), com desnutrição atual (GEa --■--) e com desnutrição pregressa (GEp --▲--), para as frequências espaciais de 0,25; 1,0; 2,0 e 8,0 cpg. As barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o GC e os demais grupos, já a cerquilha (#) representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.	23
Figura 4: Função de Sensibilidade ao Contraste (FSC) para estímulos circulares, em coordenadas polares, em crianças sem desnutrição (GC --●--), com desnutrição atual (GEa --■--) e com desnutrição pregressa (GEp --▲--), para as frequências espaciais de 0,25; 1,0; 2,0 e 8,0 cpg. As barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o GC e os demais grupos, já a cerquilha (#) representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.	25
Figura 5: Gráficos do acompanhamento de peso da Rata-Mãe (à esquerda) e da ninhada (à direita) do GC (--○--), do GEa (--□--) e do GEp (--▲--). O eixo y mostra o peso em gramas, e o eixo x mostra os dias em que houve pesagens (0, 7, 14, e 21).	36
Figura 6: Gráfico de acompanhamento de peso (eixo y) do GC (--○--), do GEa (--□--) e do GEp (--▲--), do dia 28 ao dia 70 (eixo x).	37
Figura 7: Diagrama esquemático do aparelho para aferir a capacidade visual de animais de laboratório em condições diversas. (A) Primeiro compartimento. (B) Segundo compartimento.	42
Figura 8: Labirinto de Imagens visto de cima	43
Figura 9: Diagrama esquemático de resposta comportamental. O animal responde corretamente quando escolhe o caminho que leva ao estímulo teste (com as grades senoidais), sendo assim reforçado com água no bebedouro. Quando o animal responde incorretamente, ou seja, escolhe o caminho que leva até o estímulo cinza (neutro), encontra o bebedouro vazio, ficando sem reforço.	47
Figura 10: Acuidade Visual (eixo y) do GC, GEa e GEp (eixo x) para estímulos em coordenadas cartesianas. As barras de erro verticais denotam um intervalo de confiança de 95%. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o GC e os demais grupos, já a cerquilha (#) representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.	49
Figura 11: Gráfico de barra contendo a SC (eixo y) para o GC, GEa e GEp (eixo x). As barras de erro verticais denotam um intervalo de confiança de 95%. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o GC e os demais grupos.	51

- Figura 12:** Cortes transversais da retina de ratos adultos controle, com desnutrição atual (DA) e com desnutrição pregressa (DP) marcados por meio do método de imuno-peroxidase com calbindina (CB), calretinina (CR) e parvalbumina (PV). As legendas (à direita da imagem) indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), da camada plexiforme interna (IPL) e da camada das células ganglionares (GCL). Barra de escala = 60µm. . 58
- Figura 13:** Quantidade de Células Horizontais e Amácrimas por mm² (*eixo y*) na retina central do GC, GEa e GEp (*eixo x*), obtida por meio de marcação com Calbindina. As barras de erro verticais equivalem à média ± o erro padrão da média, com intervalo de confiança de 95%. Não há diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$). 60
- Figura 14:** Quantidade de Células Horizontais por mm² (*eixo y*) na retina central do GC, GEa e GEp (*eixo x*), obtida por meio de marcação com Parvalbumina. As barras de erro verticais equivalem à média ± o erro padrão da média, com intervalo de confiança de 95%. Não há diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$). 61
- Figura 15:** Quantidade de Células Bipolares e Ganglionares por mm² (*eixo y*) na retina central do GC, GEa e GEp (*eixo x*), obtida por meio de marcação com Calretinina. As barras de erro verticais equivalem à média ± o erro padrão da média, com intervalo de confiança de 95%. Não há diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$). 62
- Figura 16:** Espessura retiniana (*eixo y*) total e por camada: ONL, INL, IPL e GCL, para o GC, GEa e GEp (*eixo x*). As barras de erro verticais equivalem à média ± o erro padrão da média, com intervalo de confiança de 95%. Não há diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$). 64
- Figura 17:** Cortes transversais do córtex visuo-sensorial primário de ratos adultos controle, com desnutrição atual (DA) e com desnutrição pregressa (DP) marcados com PAN (marcador de neurofilamentos) por meio do método de imuno-peroxidase. Barra de escala = 100 µm. 65

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - N válido utilizado para análise estatística; médias, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão dos valores de sensibilidade ao contraste dos grupos (GC, GEa e GEp) para as frequências espaciais de 0,25; 1,0; 2,0 e 8,0 cpg	24
Tabela 2 - N válido utilizado para análise estatística; médias, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão dos valores de sensibilidade ao contraste dos grupos (GC, GEa e GEp) para as frequências espaciais de 0,25; 1,0; 2,0 e 8,0 cpg	26
Tabela 3 – Composição das dietas controle e hipoproteica (em porcentagem)	35
Tabela 4: Acompanhamento de peso do dia 0 aos 21, no GC, GEa e GEp	36
Tabela 5: Acompanhamento de peso dos ratos machos (Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média) do GC, GEa e GEp, do dia 28 ao dia 70	38
Tabela 6: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da Acuidade Visual do GC, GEa e GEp	49
Tabela 7: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da SC do GC, GEa e GEp	50
Tabela 8: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da Quantidade de Células Horizontais e Amácrinas por mm ² , marcadas com Calbindina, para GC, GEa e GEp	59
Tabela 9: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da Quantidade de Células Horizontais por mm ² , marcadas com Parvalbumina para GC, GEa e GEp	60
Tabela 10: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da Quantidade de Células Bipolares e Ganglionares por mm ² , marcadas com Calretinina, para GC, GEa e GEp	62
Tabela 11: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da espessura retiniana total e das camadas: ONL, INL, IPL e GCL para GC, GEa e GEp	63

ABREVIATURAS

AV - Acuidade Visual.

CB - Calbindina.

CNPq - Conselho Nacional De Desenvolvimento Científico E Tecnológico.

CR - Calretinina.

DA - Desnutrição Atual.

DE - Desnutrição Progressa.

FSC - Função De Sensibilidade Ao Contraste.

GC - Grupo Controle.

GEa - Grupo Experimental Atual.

GEp - Grupo Experimental Progresso.

GLC - Camada Das Células Ganglionares.

INL - Camada Nuclear Interna.

IPL - Camada Plexiforme Interna.

LPNeC - Laboratório De Percepção, Neurociências E COMPORTAMENTO.

ONL - Camada Nuclear Externa.

PETI - Programa De Erradicação Do Trabalho Infantil.

PV - Parvalbumina.

PVE - Potencial Visual Evocado.

QI - Quociente de Inteligência.

SC - Sensibilidade Ao Contraste.

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do ICB.

ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

ANEXO III – Anamnese Nutricional.

ANEXO IV – Certificado da Comissão de Ética em Pesquisas com Animais do Instituto de Psicologia.

ANEXO V – Patente do: “Aparelho para Aferir a Capacidade Visual de Animais de Laboratório em Condições Diversas”.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da desnutrição proteica em humanos e em modelo animal por meio de medidas comportamentais e bioquímicas. Participaram desse estudo 60 crianças com idade de 7 a 10 anos, sendo 20 eutróficas (grupo controle, GC), 20 com desnutrição atual (grupo experimental atual, GEa) e 20 com desnutrição pregressa (grupo experimental pregresso, GEp). Esses três grupos foram replicados em modelo animal, sendo cada grupo composto por 6 ratos wistar. A acuidade visual (AV) e a sensibilidade ao contraste (SC) foram medidas por meio do método psicofísico em humanos (experimento I) e em ratos (experimento II). Para a medida comportamental com animais foi desenvolvido o Labirinto de Imagens. As análises bioquímicas foram realizadas por meio da técnica de imunohistoquímica e de morfometria da retina de 5 animais de cada grupo (experimento III). Os resultados dos testes comportamentais em humanos e em animais mostraram prejuízos no desempenho dos grupos desnutridos, principalmente no GEp, mesmo com recuperação nutricional. O Labirinto de Imagens se mostrou uma ferramenta útil para medida de parâmetros visuais em roedores. Entretanto, as análises histológicas não apresentaram diferenças significantes entre os grupos, o que provavelmente se deve ao nível de análise não ser capaz de medir componentes sinápticos, arborização dendrítica ou do sistema de neurotransmissão.

Palavras chave: desnutrição; acuidade visual; sensibilidade ao contraste; psicofísica.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 - A DESNUTRIÇÃO COMO FATOR DE RISCO	01
1.2 - A IMPORTÂNCIA DA NUTRIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO	02
1.3 - EFEITOS BIOCOMPORTAMENTAIS DA DESNUTRIÇÃO	04
1.4 - CONSEQUÊNCIAS DA DESNUTRIÇÃO PARA O SISTEMA VISUAL	07
1.5 - A ACUIDADE VISUAL E SENSIBILIDADE AO CONTRASTE VISUAL	08
2 - JUSTIFICATIVAS	11
3 - OBJETIVOS	12
3.1 - GERAL	12
3.2 - ESPECÍFICOS	12
4 - APRESENTAÇÃO	13
5 - EXPERIMENTO 1	14
5.1 - MATERIAIS E MÉTODOS	14
5.1.1 - AMOSTRA	14
5.1.2 - CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA	15
5.1.3 - ESTÍMULOS VISUAIS E EQUIPAMENTOS	17
5.1.4 - PROTOCOLO DO MÉTODO COMPORTAMENTAL COM HUMANOS	19
5.2 - RESULTADOS	21
5.2.1 - SENSIBILIDADE AO CONTRASTE PARA ESTÍMULOS EM COORDENADAS CARTESIANAS	22
5.2.2 - SENSIBILIDADE AO CONTRASTE PARA ESTÍMULOS EM COORDENADAS POLARES	24
5.3 - DISCUSSÃO	26
5.3.1 - SENSIBILIDADE AO CONTRASTE PARA ESTÍMULOS EM COORDENADAS CARTESIANAS	26
5.3.2 - SENSIBILIDADE AO CONTRASTE PARA ESTÍMULOS EM COORDENADAS POLARES	30
6 - EXPERIMENTO 2	33
6.1 - MATERIAIS E MÉTODOS	33
6.1.1 - ANIMAIS	33
6.1.2 - SITUAÇÃO NUTRICIONAL	34
6.1.3 - EQUIPAMENTO	39
6.1.4 - PROTOCOLO DE ANÁLISE COMPORTAMENTAL	44
6.2 - RESULTADOS	48
6.3 - DISCUSSÃO	51
7 - EXPERIMENTO 3	55
7.1 - MATERIAIS E MÉTODOS	55
7.1.1 - ANIMAIS	55
7.1.2 - PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	55
7.2 - RESULTADOS	58
7.2.1 - ANÁLISE DAS RETINAS	58
7.2.2 - ANÁLISE DO CÓRTEX VISUAL	64

7.2.3 – DISCUSSÃO	65
8 – CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	92

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A DESNUTRIÇÃO COMO FATOR DE RISCO

A desnutrição é um desequilíbrio entre a necessidade do corpo e a ingestão de nutrientes essenciais, seja devido a uma hipernutrição ou uma hiponutrição. No presente estudo, o termo desnutrição é utilizado em seu sentido mais comum, como sinônimo de hiponutrição, subnutrição, ou má-nutrição. A desnutrição pode ocorrer quando há baixa ingestão de nutrientes, ou seja, ingestão de nutrientes em quantidade insuficiente; ou quando há ingestão de alimentos que não contemplam todos os nutrientes essenciais necessários para a manutenção dos sistemas corporais, ou seja, ingestão de alimentos pobres em um (ou mais) dos nutrientes essenciais. Dessa forma é importante salientar que a desnutrição pode caracterizar-se tanto pela quantidade de nutrientes ingeridos quanto pela qualidade destes (Morgane et al., Mokler & Galler, 2002).

Essa deficiência pode ocorrer devido a fatores externos, como ingestão alimentar insuficiente, ou por fatores internos, como absorção deficiente do intestino (má absorção nutricional), podendo ser perpetuada de geração a geração (Allen, 1993). A desnutrição, quando acontece entre gestantes, leva um sexto das crianças a nascer com baixo peso, o que aumenta a mortalidade infantil (WHO, 2005).

Nos países em desenvolvimento, aproximadamente, um terço das pessoas possui algum tipo de deficiência vitamínica ou mineral (WHO, 2005) e um quarto das crianças em idade pré-escolar (27%) sofre de desnutrição, o que equivale a mais de 143 milhões de crianças desnutridas com menos de cinco anos de idade (UNICEF, 2007b). Segundo a World Health Organization (2002), crianças pobres tem seis vezes mais chances de morrer antes do quinto aniversário do que crianças ricas. Isso se deve, em grande parte, às condições nutricionais a que estas crianças são expostas.

A desnutrição é responsável pela morte prematura de milhões de crianças (Black et al., 2003). Quando não age como causa direta da morte infantil, age como causa secundária (WHO, 2002), deixando o organismo susceptível a infecções e a doenças como diarreia, pneumonia, malária e sarampo (Caulfield et al., Onis et al., 2004).

Contribui também como causa latente para mais da metade (53%) das mortes de crianças com menos de cinco anos de idade (WHO, 2005), totalizando mais de seis milhões por ano (UNICEF, 2007b). Segundo Black et al. (2003), isto corresponde a quase 16.000 crianças morrendo por dia, uma a cada cinco segundos. Para alterar esta situação, a United Nations Children's Fund, UNICEF (2007a) aconselha a prescrição de alimento como remédio essencial para imunização e cuidados pediátricos.

1.2 - A IMPORTÂNCIA DA NUTRIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO

A desnutrição é seguramente o fator ambiental que mais contribui para alterações permanentes no desenvolvimento do cérebro do feto e do neonato (Galler, 2001; Morgane et al., 2002). Uma nutrição adequada é essencial para o desenvolvimento estrutural, maturacional e funcional do sistema nervoso (Diaz-Cintra et al., 2007; Morgane et al., 1978; Noback & Eisenman, 1981; Winick, 1975).

Fatores cruciais referentes à como e em que extensão esse insulto nutricional afeta o sistema nervoso central são: (a) o tipo de nutriente que está sendo ingerido de modo insuficiente; nesse sentido, a desnutrição proteica tem sido a mais estudada, visto que, uma dieta deficitária quanto à ingestão de proteína, leva a uma consequente insuficiência na ingestão de aminoácidos essenciais que são necessários para a síntese proteica estrutural de enzimas, neuropeptídeos e neurotransmissores (Galler et al.,

1996); (b) a duração do insulto nutricional (desnutrição por períodos curtos ou longos); (c) a intensidade do insulto (leve, severa ou moderada); e (d) a idade em que a desnutrição acontece.

No que se refere ao fator idade em que a desnutrição acontece, a literatura aponta para a existência de um período crítico de rápido crescimento cerebral, no qual acontecem processos organizacionais precoces como a neurogênese, mielinização, migração, organização sináptica e diferenciação celular, que estão intimamente dependentes dos aminoácidos provenientes da dieta (Dobbing, 1990; Guedes et al., 2004; Smart, 1990, 1991). Nos seres humanos, o período crítico se estende desde o terceiro mês de gestação até o segundo ano de vida (Morgane et al., 1993).

Segundo Rodier (1976 e 1980), o desenvolvimento do sistema nervoso acontece em fases que seguem uma sequência. Essa sequência varia de uma área cerebral para outra ou até dentro da mesma área. Nos mamíferos, não há mudança no desenvolvimento genotipicamente ordenado; o que varia é o tempo de início e duração de cada etapa de desenvolvimento.

Esta semelhança na curva de crescimento do cérebro durante o período crítico (Figura 1), além das similaridades entre as bases neurais que subjazem o comportamento de homens e animais, como por exemplo, ratos (Kolb, 2005), justificam a utilização de modelos animais em pesquisas que visam acessar os efeitos biocomportamentais da desnutrição.

Figura 1: Curvas de desenvolvimento do cérebro de ratos e humanos (Dobbing, 1981).

Outro tecido neural que sofre influência do estado nutricional é a retina, que precisa, principalmente, de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (Morale et al., 2005), e os ômega 3 (Uauy et al., 1990, 1992, 1993, 1994; Birch et al., 1992; Hoffman et al., 1993) como ácidos linoleicos, araquidônicos e docosahexaenoicos (Berseth et al., 2011; Scalabrin et al., 2011; Uauy et al., 2003), entre outros, para se desenvolver normalmente. A falta ou deficiência desses nutrientes em bebês e crianças está relacionada a prejuízos na função visual.

1.3 - EFEITOS BIOCUMPORTAMENTAIS DA DESNUTRIÇÃO

Estudos em animais mostraram que a desnutrição causa mudanças neuroanatômicas, bioquímicas e funcionais (Almeida et al., 1996a; Bedi, 1984, 1987,

1992; Bedi & Warren, 1988; Carughi et al., 1978; Tonkiss et al., 1993). Morgane et al. (1993) encontraram diminuição no número total (Dobbing et al., 1971) e no tamanho de células neuronais, além de alterações nas ramificações dendríticas e na camada de mielina dos neurônios. Diversos estudos encontraram diminuição do peso cerebral em ratos (Brown, 1966; Jackson & Stewart, 1920) e em humanos (Engsner et al., 1974a, 1974b; Rozovski et al., 1971) desnutridos. Foram encontrados ainda, prejuízos permanentes no número de células no córtex cerebral e cerebelar (Dobbing, 1981).

O modelo hipocampal é o mais utilizado em estudos que avaliam os efeitos biocomportamentais da desnutrição, devido à importância do hipocampo em muitos processos neurais básicos. Diversas pesquisas encontraram alterações no hipocampo devido a déficit nutricional, como: (a) perda neuronal maciça nos giros dentados CA1 e CA3 (Andrade et al., 1995a; Bedi, 1991; Lister et al., 2005; Paula-Barbosa et al., 1988, 1989), (b) perda neuronal na região subicular (Andrade et al., 1998), (c) redução no número de células (Lukoyanov & Andrade, 2000), (d) redução no tamanho do soma (Cintra et al., 1990; Diaz-Cintra et al., 1991; Diaz-Cintra et al., 1994), (e) perda de conexões sinápticas (Andrade et al., 1995b; Lukoyanov & Andrade, 2000), (f) retardo na mielinização, gliogênese, diferenciação e proliferação da oligodendróglia e na maturação glial (Lai & Lewis, 1980; Lai et al., 1980).

Alterações de qualquer natureza no hipocampo podem indicar mudanças emocionais (Bailey et al., 1986; File et al., 1998; Jessa et al., 1996; Sams-Dodd et al., 1997; Smythe et al., 1998) e, principalmente, prejuízos na aprendizagem e memória (Bailey et al., 1986; Dunbar et al., 1993; Geinisman et al., 1995; Maaswinkel et al., 1999; Morris et al., 1982; O'Keefe & Nadel, 1978; Olton et al., 1978; Olton, 1983; Sterio, 1984; Whishaw, 1998; Xavier et al., 1999).

A exposição à dieta hipoproteica produz alterações no hipocampo e é responsável por diversos prejuízos cognitivo-comportamentais (Almeida et al., 1996a, 1996b, 1996c; Barnes et al., 1996; Castro et al., 1989; Castro & Rudy, 1993), principalmente quanto à memória e à aprendizagem. Esses prejuízos foram encontrados em estudos com modelo animal utilizando o labirinto aquático de Morris (Bedi, 1992; Campbell & Bedi, 1989; Castro & Rudy, 1987; Cordoba et al., 1994; Goodlett et al., 1986; Jordan et al., 1982; Tonkiss et al., 1994), o labirinto radial (Hall, 1983; Jordan et al., 1981; Simonson & Chow, 1970; Wolf et al., 1986), o labirinto de Hebb-Williams (Celedon & Colombo, 1979) e o labirinto em T (Almeida et al., 1996d; Tonkiss & Galler, 1990).

Portanto, alguns prejuízos cognitivos causados pela desnutrição já estão bem estabelecidos em modelo animal (Strupp & Levitsky, 1995), principalmente ao que se refere aos déficits de memória e aprendizagem, por meio da utilização do modelo hipocampal.

As pesquisas com seres humanos, apesar de em menor quantidade do que as pesquisas em modelo animal, também comprovam esses prejuízos. Grantham-McGregor (1995) fez uma revisão de 14 estudos que utilizaram crianças desnutridas e encontraram perda nas funções cognitivas e no desempenho escolar. Liu et al. (2004) investigaram uma série de alterações provocadas pela desnutrição, e, entre elas, encontraram redução no quociente de inteligência (QI). Essa redução também foi encontrada por Grantham-McGregor et al. (1987), e se manteve mesmo com estimulação psicossocial. Algumas pesquisas que investigaram a prevalência de déficit de atenção em crianças desnutridas apontaram uma incidência de 60%, enquanto que em crianças sem desnutrição, a prevalência desse déficit é de apenas 15% (Galler et al., 1983; Galler & Ramsey, 1989, 2006; Galler et al., 1990; Galler, 2001).

1.4 - CONSEQUÊNCIAS DA DESNUTRIÇÃO PARA O SISTEMA VISUAL

Há diversos estudos que apontam alterações no sistema visual relacionadas à desnutrição. Essas alterações atingem as lentes oculares, a retina, o nervo e o trato óptico, e os neurônios do córtex visual. Bonavolonta et al. (1989, 1991) encontraram danos oculares em ratos desnutridos, como perda da transparência do cristalino e degeneração vacuolar da camada ganglionar da retina.

As pesquisas, que relacionaram a desnutrição com o nervo óptico, mostraram alterações permanentes em sua organização, diminuição do número e diâmetro das fibras ganglionares (Bedi & Warren, 1983), além de retardo na formação da bainha de mielina, diminuição na quantidade de mielina por axônio e aumento do número de fibras sem mielina (Almeida et al., 2005). A diminuição na concentração de mielina, da ordem de 20%, também foi encontrada no trato óptico (Buchanan & Roberts, 1948). Essas alterações indicam diminuição na capacidade do nervo em transmitir impulsos, além de prejuízo na capacidade visual.

Estudos com animais expostos a dieta hipoproteica encontraram mudanças no córtex visual, como alterações estruturais nas células piramidais (Diaz-Cintra et al., 1990) e diminuição do número de sinapses por neurônio (Bedi et al., 1989; Cragg, 1972; Gundappa & Desiraju, 1988; Warren & Bedi, 1982, 1984), o que representa um déficit sináptico de 22% (Peeling & Smart, 1994a, 1994b).

Em humanos, Benítez-Bribiesca et al. (1999) realizaram análises histológicas do córtex occipital de 13 crianças que morreram de desnutrição proteica-calórica grave e encontraram encurtamento dos dendritos apicais, além de diminuição no número de espinhos dendríticos e anormalidades nestes.

1.5 – A ACUIDADE VISUAL E SENSIBILIDADE AO CONTRASTE VISUAL

A acuidade visual (AV) é definida como a recíproca da menor distância necessária para se perceber dois pontos como distintos. É uma medida clássica no estudo do desempenho do sistema visual em discriminar detalhes finos dos objetos no espaço, sendo uma medida útil para o estudo do desenvolvimento da visão espacial (Dobson & Teller, 1978).

Há, na literatura, alguns estudos que mediram a AV de recém-nascidos (SanGiovanni et al., 2000; Tornqvist & Källén, 2004), crianças (O'Connor et al., 2004; Powls et al., 1997) e adultos (Olsen et al., 2001) que nasceram com baixo peso, menor que 2,5 Kg. Porém, até o presente momento, só encontramos dois estudos que investigaram os efeitos da desnutrição na AV de crianças: (i) Durmaz et al. (1999) utilizaram o potencial visual evocado por flash de luz (PVE) em crianças desnutridas com idade entre 0 e 18 meses. Houve um aumento na latência das ondas registradas nas crianças desnutridas, o que indica prejuízo no processamento neural da visão; (ii) Dantas et al. (2005) realizaram uma pesquisa com 91 crianças de 2 a 11 anos que sofreram desnutrição grave em algum momento entre o nascimento e os 6 meses de vida. Por meio do método do olhar preferencial (Cartões de Acuidade Visual de Teller), encontraram redução na AV dessas crianças. Observaram ainda: (a) maior frequência de astigmatismo e miopia, (b) alterações fundoscópicas, como nervo óptico hipocorado, (c) alterações na coloração da retina e (d) atrofia celular no epitélio pigmentar.

Já a sensibilidade ao contraste (SC) de luminância é uma medida clássica na literatura. O estímulo tradicionalmente usado nessa medida é um padrão com grades senoidais lineares, em coordenadas cartesianas. Esse padrão corresponde a listras claras e escuras que se alternam em um espaço. Essas listras podem ser mais grossas,

equivalentes a frequências espaciais mais baixas, ou mais finas, equivalentes a frequências espaciais mais altas. A ideia é medir a quantidade mínima de contraste necessária (limiar de contraste) para um indivíduo detectar esse padrão de grade para uma dada frequência espacial. Quanto menor essa quantidade, maior é a sensibilidade ao contraste. Portanto, a SC pode ser definida como o inverso do limiar de contraste (Cornsweet, 1970).

A curva de sensibilidade ao contraste, mais conhecida como função de sensibilidade ao contraste, FSC (Campbell & Robson, 1968), tem um formato padrão, um U invertido, devido a SC normal de adultos ser maior para frequências espaciais médias; enquanto é menor para as frequências espaciais mais baixas e mais altas. Alterações neste formato padrão podem indicar alterações ópticas e neurais (Akutsu & Legge, 1995; Artal et al., 1993; Bour & Apkarian, 1996; Elliott & Situ, 1998; Vleugels et al., 1998).

Estudos eletrofisiológicos prévios indicam que estímulos simples, como grades senoidais em coordenadas cartesianas, são processados preferencialmente em áreas visuais corticais primárias, como V1, enquanto que estímulos mais complexos, como grades concêntricas em coordenadas polares (não-cartesianas), são processados preferencialmente em centros visuais além de V1, como V2 e V4 (Gallant et al., 1996; Merigan, 1996; Wilkinson et al., 2000).

Segundo David et al. (2006), a maioria dos neurônios em V1 é seletiva a grades cartesianas, porém, Hedge e Van Essen (2007), mostraram que há algumas células em V1, com campo receptivo grande e clara preferência por contornos complexos do que por barras e grades simples. Aparentemente, a seletividade para grades cartesianas e não-cartesianas não é uma propriedade emergente que aparece somente nas células em V2 ou V4 (Mahon & DeValois, 2001). De V1 para V2, a seletividade das células para

grades cartesianas diminui e aumenta para grades não-cartesianas (ver Figura 1 de Wilkinson, 2000).

Hedge e Van Essen (2007) descobriram que 61% das células em V2 respondem melhor para grades não-cartesianas do que para grades cartesianas, além de serem mais seletivas para estímulos com contorno com ângulos, intersecções, arcos e círculos, o que contradiz os achados anteriores (Hedge e Van Essen, 2003), que apontavam pra uma preferência maior em V2 para grades concêntricas.

Em V4, a maioria dos neurônios é seletiva a estímulos não-cartesianos (David et al., 2006). Sub-populações distintas, compondo 16–17% das células de V4, respondem pelo menos duas vezes mais forte para estímulos hiperbólicos, radiais ou concêntricos, do que para grades cartesianas; enquanto que pouquíssimas células (0–8%) respondem melhor para grades cartesianas (Gallant et al., 1993; 1996). Segundo Hedge and Van Essen (2007), a porcentagem de células que respondem melhor para grades não-cartesianas do que para grades cartesianas em V4 é de 65%.

Apesar de haver vários estudos que mostram diferenças no sistema visual devido à desnutrição, com medidas fisiológicas em animais (Cragg, 1972; Warren & Bedi, 1982; Gundappa & Desiraju, 1988; Bedi, Massey & Smart, 1989; Diaz-Cintra et al., 1990) e fisiológicas *post-mortem* em humanos (Benítez-Bribiesca, Rosa-Alvarez & Mansilla-Olivares, 1999), há bem menos estudos comportamentais que investigam essas diferenças, seja em ratos ou em humanos.

Por exemplo, em estudos pilotos, Santos et al. (2009) e Santos & Alencar (2010) mediram a SC de crianças com desnutrição atual e pregressa, respectivamente, para grades senoidais cartesianas e mostraram que tanto a desnutrição atual como a pregressa diminuem a SC visual, porém para faixas de frequências especiais diferentes. Alencar & Santos (2012) mediram a SC de crianças com desnutrição pregressa para grades

senoidais polares e mostraram que a desnutrição pregressa prejudica a SC visual de forma diferente para estímulos cartesianos e polares.

2 – JUSTIFICATIVAS

Diversos aspectos demonstram a relevância do presente estudo: (i) é importante conhecer a desnutrição proteica, que se constitui em um dos principais problemas de saúde coletiva em escala mundial, por sua magnitude, consequências biológicas e danos sociais (Falbo & Alves, 2002); (ii) a desnutrição causa diversos prejuízos no sistema visual, porém a literatura ainda é pobre no que se refere aos estudos com medidas comportamentais que expressem, na prática, a dimensão desses prejuízos; (iii) os problemas visuais acarretam ônus ao aprendizado e à socialização, prejudicando o desenvolvimento natural das aptidões intelectuais, escolares, profissionais e sociais (Thylefors et al., 1984); (iv) diversos autores reconheceram a associação entre o bom rendimento escolar e a saúde visual (Lauretti-Filho & Romão, 1982); (v) nos estudos que procuraram investigar a AV de desnutridos, a classificação nutricional utilizada não foi exposta, havendo pouca ou nenhuma informação acerca da etiologia, duração ou cronicidade do déficit nutricional, o que dificulta relacionar os resultados encontrados somente à desnutrição; (vi) o estudo proposto utilizou, além de seres humanos, um modelo animal e um delineamento experimental que possibilitou um controle maior e resultados mais seguros e objetivos; (vii) as medidas comportamentais da AV e da SC visual foram realizadas em um equipamento adequado e eficiente, desenvolvido especialmente para este estudo, de fácil aplicabilidade; (viii) as células retinianas e do córtex visual são intimamente relacionadas à AV e a SC visual, assim, qualquer possível alteração nas células coletadas dos animais desnutridos denota prejuízo no desempenho

em tarefas de reconhecimento; (ix) as consequências visuais da desnutrição sugerem a necessidade de uma maior atenção nutricional às crianças, por parte do governo, secretarias, ambulatorios, hospitais e da sociedade em geral; (x) a utilização conjunta de medidas comportamentais e biológicas garantem uma maior validade das alterações encontradas; (xi) este estudo é inédito no que se propõe; e (xi) traz resultados de importância para clínica, saúde pública, neurociências, oftalmologia, psicologia sensorial, psicologia cognitiva, entre outras áreas.

3 - OBJETIVOS

3.1 - GERAL

- Avaliar os efeitos da desnutrição proteica na percepção de contraste e acuidade visual em humanos e ratos *Wistar*.

3.2 – ESPECÍFICOS

➤ EXPERIMENTO 1

- Medir, por meio de método comportamental, a SC para grades senoidais lineares e verticais em coordenadas cartesianas e para grades senoidais concêntricas em coordenadas polares de crianças de 7 a 10 anos sem desnutrição, com desnutrição atual e com desnutrição pregressa.

➤ EXPERIMENTO 2

- Desenvolver e padronizar o equipamento para medidas comportamentais (Labirinto de Imagens), em ratos *Wistar* (albino), da AV e da SC para grades senoidais lineares e verticais em coordenadas cartesianas e também para grades senoidais concêntricas em coordenadas polares;
- Medir, por meio de método comportamental, a AV e a SC para grades senoidais lineares e verticais em coordenadas cartesianas e para grades senoidais

concêntricas em coordenadas polares de ratos *Wistar* sem desnutrição, com desnutrição atual e com desnutrição pregressa.

➤ **EXPERIMENTO 3**

- Realizar análises morfológicas e bioquímicas, por imuno-histoquímica, de células da retina e do córtex visual primário e superior em ratos *Wistar* sem desnutrição, com desnutrição atual e com desnutrição pregressa.

4 – APRESENTAÇÃO

Esta proposta para o doutorado direto deu continuidade aos projetos de que participei durante a graduação, vinculados ao Laboratório de Percepção, Neurociências e Comportamento (LPNeC) - UFPB, com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e com auxílio de bolsa de Iniciação Científica. Relaciona-se também ao tema da minha monografia: “Percepção Visual de Crianças com Desnutrição Atual, Pregressa ou Crônica”, sob orientação do Professor Dr. Natanael Antonio dos Santos.

Os experimentos com crianças aconteceram no LPNeC, com a colaboração do Professor Dr. Natanael Antonio dos Santos. Por meio do método psicofísico da escada com escolha forçada entre duas alternativas temporais, acessamos a SC visual de crianças com desnutrição atual e pregressa a estímulos em coordenadas cartesianas e polares.

Tanto o segundo como o terceiro experimento aconteceram no Laboratório de Neurobiologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP de São Paulo/SP. A manipulação das dietas para os animais eutróficos e desnutridos teve co-orientação do Professor Dr. Sebastião de Sousa Almeida, chefe do Laboratório de Nutrição e

Comportamento da USP de Ribeirão Preto/SP. Foram realizadas medidas de AV e SC visual por meio do método psicofísico da escada com entrada forçada entre duas alternativas espaciais.

Um terceiro experimento complementar utilizou análises morfológicas e bioquímicas da retina, para acessar por meio de técnicas de imuno-histoquímica, possíveis alterações nas células da retina e do córtex visual. Todos os três experimentos tiveram como orientador o Professor Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto.

5 - EXPERIMENTO 1

5.1. - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 - AMOSTRA

Participaram deste estudo 60 crianças (36 meninos, 60% e 24 meninas, 40%) de 7 a 11 anos de idade (média = 9,3; desvio padrão = 1,5). Todas as crianças tinham acuidade visual normal (critério de inclusão), acessada com o cartão de optotipos direcionais “E” de Rasquin (Xenônio, São Paulo/SP, Brasil) e estavam livres de doenças oculares ou neurológicas (critério de exclusão), além dos que estão relacionados à desnutrição. A triagem das crianças que compuseram a amostra foi realizada no Programa de Erradicação do Trabalho Infantil (PETI) da Comunidade Santa Clara, no bairro Castelo Branco, na cidade de João Pessoa, estado da Paraíba.

A participação de todos os voluntários levou em consideração os aspectos éticos pertinentes à investigação envolvendo seres humanos, conforme a resolução nº. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (1996). Este plano foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (ANEXO I) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). A participação das crianças

foi voluntária, e só ocorreu mediante a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pais ou responsáveis (ANEXO II).

5.1.2 - CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA

As crianças foram selecionadas e classificadas de acordo com os parâmetros antropométricos de Waterlow (Sigulem et al., 2000). Embora existam outras classificações antropométricas bastante utilizadas, como a de Gómez e a da OMS, optamos pela classificação de Waterlow por ser indicada para crianças de 2 a 10 anos, o que compreende a faixa etária que foi utilizada no presente estudo. Ela se baseia nos índices de estatura/idade e peso/estatura.

Há três classes nas quais as crianças foram inseridas: (i) **Eutrofia** (relação estatura/idade $> 95\%$ e peso/estatura $> 90\%$), ou GC (n=20), com estatura adequada para idade e peso adequado para estatura; (ii) **Desnutrição Atual ou Aguda** (relação estatura/idade $> 95\%$ e peso/estatura inferior $< 90\%$), ou GEa (n=20), com estatura adequada para idade, mas baixo peso de acordo com a estatura; e (iii) **Desnutrição Progressiva** (relação estatura/idade $< 95\%$ e peso/estatura inferior $> 90\%$), ou GEp (n=20), com estatura baixa para idade, mas peso adequado para a baixa estatura. Sigulem et al. (2000) apresentam uma boa revisão sobre o diagnóstico do estado nutricional da criança e do adolescente.

Por meio da abertura e aprovação de um processo junto à Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba, tivemos acesso aos Cartões da Criança contendo o acompanhamento do peso do nascimento aos dois anos de idade, feito pelo Programa de Saúde da Família (PSF).

Os dados contidos nos cartões foram utilizados para corroborar a classificação antropométrica de Waterlow, confirmando que: (a) as crianças com eutrofia não apresentaram déficit de peso ou altura até o momento presente; (b) as crianças com desnutrição atual não apresentaram déficit de peso ou altura em nenhum momento do nascimento até os dois anos de idade; porém apresentam déficit de peso atual, apesar de estatura adequada; e (c) as crianças com desnutrição pregressa apresentaram baixo peso durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso (Morgane et al., 1993), por pelo menos seis meses, em algum momento do nascimento até os dois anos de idade, e passaram por uma recuperação nutricional, não apresentando atualmente déficit de peso, apesar de apresentarem uma baixa estatura de acordo com a idade.

Há um terceiro tipo de desnutrição, a desnutrição crônica, que não foi encontrado na população triada para esse estudo. A desnutrição crônica acontece quando a criança teve desnutrição dos zero aos dois anos, e ainda tem desnutrição atualmente. Ou seja, equivale a uma desnutrição pregressa, porém sem recuperação nutricional. Essa prevalência de apenas dois tipos de desnutrição no país, atual e pregressa, ao invés de três, pode se dever ao procedimento utilizado pelo PSF. Os agentes de saúde do PSF só continuam a monitoração do peso das crianças com mais de dois anos de idade, indo até suas casas regularmente, quando essas crianças apresentaram desnutrição do nascimento aos dois anos. Assim, essas crianças são acompanhadas de perto e, em sua maioria, são recuperadas com introdução de fórmulas lácteas. Esses casos são os de desnutrição pregressa, e a recuperação nutricional, impede o aparecimento da desnutrição crônica.

Por outro lado, as crianças que não apresentaram desnutrição nesse período, só tem o peso monitorado, quando são levadas por seus pais ou responsáveis à sede local

do PSF, o que raramente acontece. Assim, essas crianças que deixam de ser acompanhadas, muitas vezes integram o grupo de crianças com desnutrição atual.

Uma entrevista foi realizada com as mães das crianças selecionadas para o estudo, visando uma anamnese da história nutricional da criança. Para tanto, foram investigadas características gerais da família, como peso e altura dos pais, nutrição da mãe durante a gestação e amamentação, nutrição do bebê e problemas de saúde da mãe e da criança (ANEXO III).

5.1.3 – ESTÍMULOS VISUAIS E EQUIPAMENTOS

Foram utilizados estímulos acromáticos e estáticos, circularmente simétricos, com diâmetro de aproximadamente 7,2 graus de ângulo visual, gerados em tons de cinza e com luminância média de 40,1 cd/m². Os estímulos de teste (ver Figura 2) eram grades senoidais lineares e verticais (Campbell & Grenn, 1965), definidas em coordenadas cartesianas de 0,25; 1,0; 2,0 e 8,0 ciclos por grau de ângulo visual (cpg) e grades senoidais concêntricas (Kelly, 1960) definidas em coordenadas polares e com as mesmas frequências espaciais. O estímulo neutro era totalmente cinza e continha apenas a luminância média.

Figura 2: Exemplos de um estímulo neutro e estímulos de teste, em coordenadas cartesiana e polar, respectivamente, calibrados para serem vistos a uma distância de 150 cm.

Os estímulos foram calibrados para aparecer no centro da tela do monitor de vídeo, a 150 cm de distância do observador. Uma cadeira fixa e um apoio de testa e queixo foram utilizados para controlar a distância. O monitor utilizado, para formar e apresentar os estímulos, era um CRT (Cathodic Ray Tube) cromático, da marca LG, com tela de 19 polegadas, com resolução de 1024 x 768 pixels e frequência de atualização da imagem de 70 Hz, controlado por um microcomputador com conectores de vídeo VGA e DVI.

A proporção de alcance dinâmico do monitor foi ampliada mais de 64 vezes, por um processador de vídeo digital, BITS++ (Cambridge Research Systems, Rochester, Kent, England). Os 8 bits por canal, ou 24 bits por pixel, existentes no monitor comum, que equivalem a 256 (ou 2^8) níveis em escalas de cinza, foram ampliados para 14 bits por canal, ou 42 bits por pixel, que equivalem a mais de 16.384 (ou 2^{14}) níveis em escalas de cinza, o que possibilita o uso de um computador tradicional para experimentos com alta resolução de contraste. Esse software trabalhou em conjunto com um programa desenvolvido pelo grupo, escrito em linguagem C++, para gerar os estímulos, controlar a apresentação e registrar os valores de limiar de contraste.

O programa LightScan, com um fotômetro OptiCAL (Cambridge Research Systems, Rochester, Kent, England), mediu a luminância da tela e realizou a correção *gamma*, utilizando como amostra 256 pontos, de 0 a 255 (*gamma* = 1,0). Os valores de luminância mínima e máxima da tela foram de 0,20 cd/m² e 80,0 cd/m², respectivamente (luminância média = 40,1 cd/m²) e a luminância de fundo foi a própria luminância mínima. A sala do laboratório media 2,5 por 2,0 metros, com uma lâmpada fluorescente Philips de 20W acesa. As paredes eram cinza para melhor controle da iluminação do ambiente durante o experimento.

5.1.4 – PROTOCOLO DO MÉTODO COMPORTAMENTAL COM HUMANOS

Os experimentos só começaram quando o experimentador estava certo de que os participantes entenderam e responderam de acordo com as instruções. Neste contexto, as instruções foram repetidas e treinadas em uma sessão de familiarização com as condições do experimento.

Todas as crianças responderam de acordo com a seguinte instrução: “Pares de círculos aparecerão na tela, primeiro um e depois o outro. Um deles será totalmente cinza, enquanto o outro terá listras claras e escuras (ou círculos claros e escuros, no caso dos estímulos em coordenadas polares). Quando o círculo com listras claras e escuras aparecer em primeiro lugar, você deve apertar o botão esquerdo do mouse (botão 1); quando o círculo com as listras claras e escuras aparecer em segundo lugar, você deve apertar o botão direito do mouse (botão 2)”.

Uma sequência de estímulos foi apresentada durante cada sessão experimental começando com um bipe. Imediatamente após o bipe, havia a apresentação do primeiro estímulo por 2 segundos. E após um intervalo de 1 segundo, o segundo estímulo era apresentado por 2 segundos. Então, o voluntário respondia apertando o botão 1 ou 2 do mouse. Todas as crianças responderam dentro de um intervalo de até 3 segundos. Uma resposta correta era seguida por outro bipe. O intervalo entre tentativas era de 3 segundos, independentemente da resposta (ou escolha) ser correta ou incorreta. O bipe que indicava o início da apresentação dos pares de estímulos era diferente daquele que indicava uma resposta correta.

Os participantes realizaram os experimentos com visão binocular e pupila normal, a distância de 150 cm da tela onde os estímulos foram apresentados. A SC visual de todos os voluntários foi estimada por meio do método psicofísico da escada

com rastreamento de resposta e escolha forçada entre duas alternativas temporais (Wetherill & Levitt, 1965).

O procedimento para medir o limiar de contraste para cada frequência espacial consistiu na apresentação de pares sucessivos de estímulos elementares: um deles era o estímulo teste que deveria ser identificado pelo participante (o primeiro ou o segundo estímulo de cada par) e o outro era o estímulo neutro contendo apenas a luminância média (no caso do estímulo de teste ser o primeiro de cada par, o estímulo neutro era o segundo; enquanto que quando o estímulo de teste era o segundo, o estímulo neutro era apresentado primeiro).

A ordem da apresentação dos estímulos e das frequências era randomizada pelo programa. O critério utilizado para alterar o contraste durante a sessão experimental foi o de três acertos consecutivos para reduzir o contraste em 20%, e de um erro para aumentar na mesma porcentagem ($3\downarrow 1\uparrow$). A redução, ou acréscimo de 20%, era sempre sobre o valor restante de contraste.

As medidas de limiar de contraste começaram com o estímulo teste em nível supralimiar (contraste = 1 ou 100%). Cada vez que a criança respondia corretamente, o contraste diminuía sucessivamente até que ela cometesse um erro. O programa registrava o último valor de contraste percebido. O contraste então aumentava até que a criança conseguisse perceber o estímulo novamente. Nesse caso, o programa registrava o primeiro valor de contraste percebido. A sessão experimental terminava automaticamente quando seis valores de contraste eram registrados. Esse procedimento foi repetido para cada frequência espacial em coordenadas cartesianas e polares. Após um intervalo de pelo menos 48 horas, as crianças passaram por um reteste e mais seis valores de contraste, para cada frequência espacial e estímulo, foram registrados.

O limiar de contraste calculado para cada criança e utilizado na análise estatística foi a média aritmética dos 12 valores de contraste (seis no teste e seis no reteste). Para mais informações ver Santos, Alencar e Dias (2009); Santos e Alencar (2010); e Alencar e Santos (2012). Os dados de limiar de contraste foram transformados em valores de Sensibilidade ao Contraste ($SC=1/\text{limiar}$) e em seguida, foram convertidos em escala logarítmica.

5.2 – RESULTADOS

O tratamento estatístico consistiu primeiramente na realização de um teste para outliers (teste Tukey two sided). Este teste denomina como outlier os valores que estão acima do percentil 75 ou abaixo do percentil 25, porém, nenhum valor foi identificado como outlier. Além disso, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov que verificou que os dados, por condição nutricional e por frequência espacial, seguem uma distribuição normal. O teste de homogeneidade de variâncias de Levine mostrou que os grupos possuem homogeneidade de variância. Assim, todos os pressupostos (não existência de valores extremos ou outliers, distribuição normal e homogeneidade de variância) foram atendidos para a realização de testes paramétricos, ou seja, generalizáveis para população.

Para análise dos dados, foi utilizado um delineamento misto, considerando que o fator condição nutricional é um fator independente ou categórico, enquanto que o fator SC para as quatro frequências espaciais medidas é um fator dependente e de medidas repetidas. Utilizou-se a *Repeated Measures Analysis of Variance*, ou ANOVA, para medidas repetidas com o objetivo de verificar diferenças estatísticas entre os grupos

(GC, GEa e GEp). O teste post hoc Tukey HSD foi utilizado para identificar entre quais grupos e para quais frequências espaciais houve diferenças estatísticas na SC.

Os dados obtidos com os estímulos em coordenadas cartesianas e em coordenadas polares foram analisados separadamente, pois, não há sentido em comparar dois estímulos que de partida já são diferentes e, inclusive, são processados em áreas visuais diferentes.

5.2.1 - SENSIBILIDADE AO CONTRASTE PARA ESTÍMULOS EM COORDENADAS CARTESIANAS

A ANOVA aplicada aos dados de sensibilidade ao contraste para o estímulo linear, em coordenada cartesiana, mostrou diferença significativa entre os grupos [$F(2,57)=48,50;p<0,05;\alpha=1,00$], entre as frequências espaciais [$F(3,171)=233,13;p<0,05;\alpha=1,00$] e interação [$F(6,171)=21,60;p<0,05;\alpha=1,00$] (ver Figura 3 e Tabela 1).

Figura 3: Função de Sensibilidade ao Contraste (FSC) para estímulos em coordenadas cartesianas, em crianças sem desnutrição (GC --●--), com desnutrição atual (GEa --■--) e com desnutrição pregressa (GEp --▲--), para as frequências espaciais de 0,25; 1,0; 2,0 e 8,0 cpg. As barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o GC e os demais grupos, já a cerquilha (#) representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

Como havia 3 grupos, o post hoc Tukey HSD foi utilizado para verificar entre quais grupos houve diferença. O teste mostrou diferença significativa entre todos os grupos, GC x GEa, GC x GEp e GEa x GEp ($p < 0,05$). A análise com o post hoc Tukey HSD (Tabela 1) mostrou que: (a) o GC versus o GEa foi 10% e 11% mais sensível para perceber as frequências espaciais de 1,0 e 2,0 cpg, respectivamente ($p < 0,05$); (b) o GC comparado ao GEp foi 33%; 60% e 53% mais sensível para perceber as frequências espaciais de 0,25; 1,0 e 2,0 cpg, respectivamente ($p < 0,05$); (c) o GEa versus o GEp foi 24%; 45% e 37% mais sensível para perceber as frequências espaciais de 0,25; 1,0 e 2,0

cpg, respectivamente, e 27% menos sensível para perceber a frequência espacial de 8,0 cpg ($p<0,05$).

Tabela 1 - N válido utilizado para análise estatística; médias, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão dos valores de sensibilidade ao contraste dos grupos (GC, GEa e GEp) para as frequências espaciais de 0,25; 1,0; 2,0 e 8,0 cpg

	N válido	Média	Valor Mínimo	Valor Máximo	Desvio Padrão	Erro Padrão
GC						
0,25	20	1,544464*	1,338990	1,761889	0,129345	0,028922
1,0	20	2,110141*	1,778512	2,244861	0,138266	0,030917
2,0	20	2,079722*	1,928559	2,235099	0,094312	0,021089
8,0	20	0,870832	0,412777	1,274270	0,253826	0,056757
GEa						
	N válido	Média	Valor Mínimo	Valor Máximo	Desvio Padrão	Erro Padrão
0,25	20	1,438513#	1,090806	1,760315	0,157665	0,035255
1,0	20	1,911974*#	1,403599	2,291941	0,248716	0,055615
2,0	20	1,867570*#	1,318095	2,233236	0,280317	0,062681
8,0	20	0,771592#	0,374425	1,230263	0,223724	0,050026
GEp						
	N válido	Média	Valor Mínimo	Valor Máximo	Desvio Padrão	Erro Padrão
0,25	20	1,156309*#	0,922734	1,375626	0,105491	0,023588
1,0	20	1,315531*#	0,886886	2,157979	0,409220	0,091504
2,0	20	1,360852*#	0,840326	2,215363	0,362066	0,080961
8,0	20	0,981671#	0,575915	1,192922	0,208821	0,046694

Legenda: O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre o GC e os demais grupos, já a cerquilha (#) representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

5.2.2 - SENSIBILIDADE AO CONTRASTE PARA ESTÍMULOS EM COORDENADAS POLARES

A ANOVA aplicada aos dados de sensibilidade ao contraste para os estímulos em coordenadas polares mostrou diferença significativa entre os grupos [$F(2,57)=13,31; p<0,05; \alpha=0,99$], entre as frequências espaciais [$F(3,171)=831,64; p<0,05; \alpha=1,00$] e interação [$F(6,171)=8,29; p<0,05; \alpha=0,99$] (ver Figura 4 e Tabela 2).

Figura 4: Função de Sensibilidade ao Contraste (FSC) para estímulos circulares, em coordenadas polares, em crianças sem desnutrição (GC --●--), com desnutrição atual (GEa --■--) e com desnutrição pregressa (GEp --▲--), para as frequências espaciais de 0,25; 1,0; 2,0 e 8,0 cpg. As barras verticais denotam intervalo de confiança de 95%. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o GC e os demais grupos, já a cerquilha (#) representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

Como havia 3 grupos, o post hoc Tukey HSD foi utilizado para verificar entre quais grupos houve diferença. O teste mostrou diferença significativa entre todos os grupos, GC x GEa, GC x GEp e GEa x GEp ($p < 0,05$). A análise com o post hoc Tukey HSD para grupos x SC (Tabela 2) mostrou que: (a) o GC comparado ao GEa foi 12% mais sensível para perceber as frequências espaciais de 1,0 e 2,0 cpg ($p < 0,05$), (b) o GC comparado ao GEp foi 6% e 49% mais sensível para perceber as frequências espaciais de 0,25 e 8,0 cpg, respectivamente ($p < 0,05$), (c) o GEa comparado ao GEp foi 37% mais sensível para perceber a frequência espacial de 8,0 cpg, entretanto, foi 8% menos sensível para perceber as frequências espaciais de 1,0 e 2,0 cpg ($p < 0,05$).

Tabela 2 - N válido utilizado para análise estatística; médias, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão dos valores de sensibilidade ao contraste dos grupos (GC, GEa e GEp) para as frequências espaciais de 0,25; 1,0; 2,0 e 8,0 cpg

	N válido	Média	Valor Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Erro Padrão
GC						
0,25	20	1,256865*	1,003630	1,520907	0,142283	0,031815
1,0	20	1,543687*	1,283604	1,747113	0,122777	0,027454
2,0	20	1,410410*	1,240703	1,605684	0,105203	0,023524
8,0	20	0,678478*	0,447114	0,974874	0,139590	0,031213
GEa						
	N válido	Média	Valor Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Erro Padrão
0,25	20	1,189266	1,042352	1,364985	0,096398	0,021555
1,0	20	1,383776*#	1,175308	1,634741	0,142757	0,031921
2,0	20	1,255320*#	1,096759	1,485580	0,115725	0,025877
8,0	20	0,624244#	0,273065	0,906449	0,142600	0,031886
GEp						
	N válido	Média	Valor Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Erro Padrão
0,25	20	1,181809*	0,994095	1,380899	0,108486	0,024258
1,0	20	1,500545#	1,249369	1,623815	0,099626	0,022277
2,0	20	1,360827#	1,233139	1,488689	0,075355	0,016850
8,0	20	0,456028*#	0,233474	0,626119	0,093595	0,020928

Legenda: O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o GC e os demais grupos, já a cerquilha (#) representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

5.3 - DISCUSSÃO

5.3.1 – SENSIBILIDADE AO CONTRASTE PARA ESTÍMULOS EM COORDENADAS CARTESIANAS

A SC para estímulos em coordenadas cartesianas é uma ferramenta clássica e foi utilizada em diversos estudos que investigaram crianças sem (Bradley & Freeman, 1982; Adams & Courage, 2002; Benedek, Benedek, Kéri, & Janáky, 2003) e com diversas alterações (ambliopia: Montés-Micó & Ferrer-Blasco, 2001; Síndrome de dawn: Courage, Adams, & Hall, 1997). O presente estudo avaliou os efeitos da desnutrição atual e pregressa na SC visual para estímulos em coordenadas cartesianas em crianças de 8 a 11 anos de idade. A desnutrição atual é caracterizada por um insulto

nutricional recente, ou atual, quando a criança não teve história de desnutrição do nascimento aos 2 anos de idade, porém atualmente apresenta baixo peso. Uma criança com desnutrição atual tem a estatura ideal para a idade, mas apresenta baixo peso em relação à estatura. Já a desnutrição pregressa é caracterizada por um insulto nutricional passado, em um período crucial no desenvolvimento do sistema nervosa central e do sistema visual, quando a desnutrição representa um alto risco, seguido por reabilitação nutricional. Em humanos, esse período crítico se estende do terceiro mês de gestação aos 2 anos de idade (Morgane et al., 1993). Uma criança com desnutrição pregressa tem baixa estatura em relação a sua idade, mas tem peso normal em relação à sua (baixa) estatura. A principal hipótese deste estudo foi que a desnutrição, com ou sem recuperação nutricional, prejudica o desempenho visual de crianças.

Tanto o grupo controle quanto os grupos experimentais apresentaram o mesmo padrão de resposta para as frequências espaciais, ou seja, pico de sensibilidade para as frequências espaciais médias (1,0 e 2,0 cpg) e sensibilidade menor para a frequência espacial mais baixa (0,25 cpg) e para a frequência espacial mais alta (8,0 cpg). Esse padrão de resposta, o clássico U invertido, é bem estabelecido para grades cartesianas estáticas ou moduladas por frequência temporal.

Os resultados mostraram que a SC cartesiana de crianças normais e de crianças com desnutrição atual ou pregressa são diferentes. A desnutrição atual causou um decréscimo na SC cartesiana para as frequências espaciais médias (1,0 e 2,0 cpg); enquanto que a desnutrição pregressa causou um decréscimo muito mais acentuado, que abrangeu a SC para a frequência espacial mais baixa (0,25 cpg), e para as frequências espaciais médias (1,0 e 2,0 cpg).

Este prejuízo na SC mais proeminente nas crianças com desnutrição pregressa pode ser explicado considerando-se que esse tipo de desnutrição se caracteriza por um

déficit nutricional em um período crítico para o desenvolvimento neural, o que aumenta a susceptibilidade ao ambiente (Dobbing, 1990; Guedes et al. 2004; Smart, 1990, 1991). Além disso, a desnutrição pregressa afeta os primeiros dois anos de vida da criança, quando o sistema visual é imaturo do ponto de vista morfológico, neurofisiológico e perceptual (Brown, 1966; Candy et al., 1998; van Sluyters et al., 1990; Wilson, 1988).

As revisões de van Sluyters *et al.*, 1990 e Wilson, 1998 discutem algumas diferenças no sistema visual imaturo em comparação com o sistema visual adulto, como tamanho da fóvea, morfologia dos cones (corpo celular, segmento interno e segmento externo), diâmetro pupilar, espaço entre fotorreceptores, entre outros. Isso explica porque tantos aspectos responsáveis pela emergência da percepção visual humana (por exemplo: acuidade visual, sensibilidade ao contraste, visão binocular, dentre outros) estão reduzidos no recém-nascido em comparação com o adulto (Brown, 1966; Candy et al., 1998; van Sluyters et al., 1990). Portanto, é esperado que um insulto que interfere com o sistema visual antes ou durante o período de maturação da retina, das vias visuais centrais e do processo de mielinização das fibras nervosas e do trato óptico, pode alterar a SC visual cartesiana.

O grande decréscimo encontrado na SC, para frequências espaciais baixas e médias, das crianças com desnutrição pregressa, pode ser porque no período crítico de desenvolvimento do cérebro, quando elas sofreram o insulto nutricional, a resposta do sistema visual é predominantemente sintonizada para frequências espaciais baixas e médias (Adams et al., 2002; Norcia et al., 1990; Suter et al., 1994; Wilson, 1998).

Nessa mesma época, o desenvolvimento das estruturas que processam frequências espaciais baixas e médias já está praticamente pronto, enquanto que as estruturas ou canais que processam frequências espaciais altas, ainda estão no começo

do desenvolvimento, o que justifica a SC para a frequência de teste alta, 8,0 cpg, não ter sofrido prejuízo nas crianças com desnutrição pregressa. Uma boa revisão sobre essa teoria, chamada de teoria dos canais múltiplos, originalmente proposta por Campbell e Robson (1968), pode ser encontrada em DeValois e DeValois (1988).

Esses resultados indicam que o desempenho das crianças com desnutrição atual ou pregressa para distinguir um objeto de outros objetos ou de um fundo, em baixas condições de contraste, é reduzido, principalmente em crianças com desnutrição pregressa. Considerando-se que cada faixa de frequências espaciais fornece informações diferentes a cerca do objeto (Bar, 2004), a interação da desnutrição atual ou pregressa com as estruturas ou mecanismos que processam as frequências espaciais baixas e médias reduz a habilidade da criança para processar informações globais relativas ao formato do estímulo (fornecidas por frequências espaciais baixas). Porém, aparentemente, essa mesma interação não altera as estruturas que processam informações referentes a detalhes mais finos dos objetos (fornecidos por frequências espaciais mais altas).

É difícil comparar diretamente os resultados desse estudo com os resultados de outros estudos citados que envolvem seres humanos. Há importantes diferenças amostrais, teóricas e metodológicas, como por exemplo, os parâmetros antropométricos utilizados para classificar e diagnosticar a desnutrição, que variam bastante de acordo com a idade (Sawaya, 2006; Sigulem, Devincenzi, & Lessa, 2000). Como é o caso da classificação de Waterlow, utilizada no presente estudo, que só é adequada para crianças entre 2 e 10 anos de idade (Sigulem et al., 2000).

Também é difícil atribuir as alterações encontradas na SC somente à desnutrição proteica, visto que ela está, geralmente, associada a várias outras deficiências nutricionais, como ácidos graxos essenciais, micronutrientes, e outros (Guesry, 1998). A

falta de controle sobre os fatores ambientais é um dos problemas encontrados em estudos que investigam os efeitos da desnutrição em seres humanos, e essa é a razão para os estudos de maior validade interna serem conduzidos em animais.

5.3.2 – SENSIBILIDADE AO CONTRASTE PARA ESTÍMULOS EM COORDENADAS POLARES

Poucos estudos examinaram o desenvolvimento da SC para grades não-cartesianas (Alencar & Santos, 2012; Santos, França, & Cruz, 2007; Santos et al., 2008). Nesse contexto, o presente estudo avaliou os efeitos da desnutrição atual e pregressa na SC visual para estímulos em coordenadas polares em crianças de 8 a 11 anos de idade. A principal hipótese deste estudo foi que a desnutrição, por afetar funções cognitivas superiores, também altere a sensibilidade ao contraste para estímulos não cartesianos, como os estímulos em coordenadas polares, provavelmente são processados em áreas visuais corticais diferentes das áreas que processam grades cartesianas.

Essa suposição é baseada em pesquisas psicofísicas (Wilson, Wilkinson, & Asaad, 1997; Wilson & Wilkinson, 1998) e neurofisiológicas (Heywood, Gadotti, & Cowey, 1992; Gallant et al., 1996; Merigan, 1996; Wilkinson et al., 2000) sugerindo que os estímulos visuais cartesianos são decodificados no córtex visual primário, ou V1, enquanto que estímulos visuais circulares são decodificados em áreas corticais visuais extraestriadas, como V4 e córtex inferotemporal.

Segundo Wilkinson (2000), padrões paralelos provocam uma ativação significativamente mais fraca em V4 do que padrões concêntricos ou radiais. As faces ativam V4 no mesmo nível que padrões concêntricos ou radiais. Isso sugere que as áreas

cerebrais envolvidas com a percepção de faces, podem ter um viés para padrões concêntricos, devido à importância de estruturas semicirculares na definição do formato da cabeça (Wilson, Wilkinson, Lin, & Castillo, 2000).

De acordo com Wilson et al. (2000), grades concêntricas em coordenadas polares produzem cerca de metade da ativação causada por faces na área fusiforme, corroborando com a hipótese de que as estruturas concêntricas podem ser um aspecto importante na percepção de faces. Entretanto, as células de V4 que são ativadas por estímulos concêntricos, podem contribuir para a análise de uma gama muito maior de objetos, além de faces.

Kelly (1960) foi o primeiro a introduzir o uso de estímulos circulares concêntricos em pesquisas com visão há mais de 50 anos. De acordo com esse pesquisador, os estímulos não-cartesianos parecem ser mais naturais, considerando o formato simétrico e circular da retina. Adicionalmente, esses estímulos circulares fornecem um centro de fixação claramente perceptível (Kelly & Magnuski, 1975), o que não ocorre com grades paralelas lineares. Os primeiros estudos que mediram e compararam a SC para barras senoidais verticais e para grades concêntricas moduladas pela função de Bessel foram conduzidos por Kelly e Magnuski (1975) e por Kelly (1982).

Os valores de SC reportados aqui para o grupo controle são similares aos reportados por Santos, França e Simas (2008), que mediram a SC para estímulos circulares concêntricos, também modulados pela função de Bessel, em crianças de 4 a 7 anos de idade e em jovens adultos, utilizando o mesmo equipamento e procedimentos utilizados no presente estudo. A SC não-cartesiana modulada pela função de Bessel é conhecidamente menor do que a SC cartesiana linear para todas as idades. (ver a Figura 2 em França & Santos, 2006).

Um dos achados mais importantes de Zana e Cavalcanti (2005), que também corroboram com os resultados desta pesquisa, foi que a função de SC concêntrica, modulada pela função de Bessel, tem um formato muito distinto das outras curvas por se comportar como um filtro passa-baixa, com pico de sensibilidade na frequência espacial de 1,5 cpg ou mais em uma frequência espacial mais baixa, e sensibilidade extremamente baixa para estímulos com frequência espacial alta.

Os resultados mostram que, de forma geral, tanto a desnutrição atual como a pregressa diminuem a SC para grades em coordenadas polares. Essas perdas indicam uma redução na visibilidade de bordas curvilíneas, que formam os limites da maioria dos objetos no mundo natural, especialmente em condições de baixo contraste.

A análise estatística revelou um decréscimo na SC das crianças com desnutrição atual para as frequências espaciais médias (1,0 e 2,0 cpg), semelhantes ao ocorrido nos testes com estímulo em coordenadas cartesianas. Porém, a análise revelou um decréscimo na SC das crianças com desnutrição pregressa para as frequências espaciais nos dois extremos da curva (0,25 e 8,0 cpg), tanto para frequências espaciais baixas como para as altas. Neste caso, o GE_p que não apresentou prejuízo na SC para frequências espaciais altas em coordenadas cartesianas, apresentou esse prejuízo para estímulos em coordenadas polares.

Comparando o GE_a com o GE_p, as crianças do primeiro grupo foram menos sensíveis para perceber as frequências espaciais médias (1,0 e 2,0 cpg) e mais sensíveis para perceber a frequência espacial mais alta (8,0 cpg). Esses resultados mostram que a desnutrição atual e a pregressa interagem de forma diferente com as estruturas ou mecanismos que processam estímulos em coordenadas polares. É possível inferir também que as estruturas ou canais que processam faixas de frequências espaciais se desenvolvem de forma diferente para estímulos em coordenadas cartesianas e polares.

É provável que a desnutrição, tanto atual (Santos et al., 2009), como pregressa (Santos & Alencar, 2010), além de afetar áreas corticais visuais primárias, pode afetar áreas corticais visuais superiores, incluindo V2, V4, e o córtex inferotemporal. A utilização dos estímulos não-cartesianos podem contribuir na avaliação do padrão de processamento em áreas visuais superiores, além de V1 e V2.

6 – EXPERIMENTO 2

6.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 - ANIMAIS

A utilização dos animais levou em consideração os aspectos éticos que regem a experimentação animal, de acordo com a Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, baseadas no “*US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*”. Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas com Animais, do Instituto de Psicologia da USP (ANEXO IV). Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas, utilizando-se iluminação artificial, com a fase clara começando às 6 horas (toda a análise comportamental ocorreu na fase clara). A temperatura do biotério foi controlada entre 23-25 ° C.

Foram utilizados 60 ratos albinos machos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)*, provenientes do biotério de criação do Instituto de Ciências Biomédicas da USP de São Paulo. Dez ninhadas, compostas pela rata mãe e seus filhotes imediatamente após o nascimento, foram recebidas no biotério de manutenção do mesmo Instituto. Para evitar variáveis genéticas, todos os filhotes foram misturados e divididos, aleatoriamente, para composição das dez ninhadas utilizadas nesse estudo. Cada ninhada foi composta pela rata-mãe, seis filhotes machos e duas fêmeas. Essa

composição, incluindo fêmeas, visou simular uma ninhada natural, porém, para compor a amostra deste estudo, só foram utilizados os filhotes machos de cada ninhada, a fim de se evitar possíveis efeitos referentes ao ciclo estral das fêmeas.

6.1.2 - SITUAÇÃO NUTRICIONAL

As 10 ninhadas utilizadas foram divididas, aleatoriamente, em três grupos. O grupo controle sem desnutrição (GC), o grupo experimental com desnutrição atual (GEa) e o grupo experimental com desnutrição pregressa (GEp) foram compostos por 6 ratos machos cada. Toda dieta foi produzida, peletizada e fornecida pela Rhoster (*Indústria e Comércio LTDA, Brasil*). As dietas foram preparadas segundo a AIN 93 G (American Institute of Nutrition, version 1993 growth) conforme descrito na Tabela 3 (Reeves et al., 1993; Rocinholi et al., 1997; Santucci, Daud et al., 1994).

Os animais dos grupos experimentais receberam uma dieta hipoproteica; com 6% de proteína; 60% de amido de milho; 18,31% de amido de milho dextrinizado; 1% de celulose microfina; 8% de óleo de soja; 5% de pré-mix mineral; 1% de pré-mix vitamínico; 0,3% de L-cistina; 0,25 de bitartaro de colina e 0,14% de Terc-butilhidroquinona (TBHQ), enquanto que o GC recebeu uma dieta normoproteica; com 16% de proteína; 50% de amido de milho e a mesma porcentagem dos demais constituintes da dieta deficiente em proteína.

Tabela 3 – Composição das dietas controle e hipoproteica (em porcentagem)

<i>Componentes</i>	<i>AIN 93G</i>	<i>AIN 93G hipoproteica</i>
Caseína	16%	6%
Amido de Milho	50%	60%
Amido de Milho Dextrinizado	18,31%	18,31%
Celulose Microfina	1%	1%
Óleo de soja	8%	8%
Pré-mix Mineral	5%	5%
Pré-mix Vitamínico	1%	1%
L-cistina	0,3%	0,3%
Bitartaro de Colina	0,25%	0,25%
TBHQ	0,14%	0,14%

Durante a fase de amamentação, a dieta foi oferecida às ratas-mães e aos filhotes. Semanalmente, nos dias 0, 7, 14 e 21, cada ninhada foi pesada. O controle de peso dos animais de todos os grupos, do dia 0 aos 21 dias (Figura 5) foi realizado a partir de dois parâmetros, o peso da rata-mãe, e o peso da ninhada com 8 filhotes (6 machos + 2 fêmeas). Nesse período, o GC e o GEa estavam recebendo dieta normoproteica, enquanto que o GEp estava recebendo dieta hipoproteica. Não foi possível a realização de análises estatísticas válidas, quanto a esses dois parâmetros, devido ao n ser baixo.

Figura 5: Gráficos do acompanhamento de peso da Rata-Mãe (à esquerda) e da ninhada (à direita) do GC (---○---), do GEa (---□---) e do GEp (---▲---). O *eixo y* mostra o peso em gramas, e o *eixo x* mostra os dias em que houve pesagens (0, 7, 14, e 21).

Os resultados indicam que o peso das Ratas-Mãe nos três grupos não variou muito. Entretanto, o peso da Rata-Mãe do GEp, apesar de ter começado igual ao GC e ao GEa, diminuiu consideravelmente ao longo das pesagens. O peso das três ninhadas aumentou nesse período, porém, o peso do GEp aumentou menos do que os outros grupos (Tabela 4).

Tabela 4: Acompanhamento de peso do dia 0 aos 21, no GC, GEa e GEp

Grupo	Sub-grupo	N	Peso no Dia 0	Peso no Dia 7	Peso no Dia 14	Peso no Dia 21
GC	Rata-Mãe	01	258	285	319	352
GEa	Rata-Mãe	01	248	265	291	273
GEp	Rata-Mãe	01	252	248	234	207
GC	Ninhada	06	54	169	312	494
GEa	Ninhada	06	53	149	261	430
GEp	Ninhada	06	55	114	171	248

No dia 21, aconteceu o desmame e os animais de sexo feminino foram descartados. Os ratos que participaram do experimento 2 (6 animais machos de cada grupo), foram pesados semanalmente, porém a partir do desmame, os animais eram pesados individualmente, do dia 28 ao dia 70 (Figura 6).

Os animais do GC, que consumiram dieta normoproteica do dia 0 ao 21, continuaram recebendo dieta normoproteica até o fim dos experimentos. Porém, no dia 49, houve troca de dieta para os grupos experimentais. O GEa, que recebeu dieta normoproteica do dia 0 ao 48, passou por uma restrição nutricional, recebendo dieta hipoproteica a partir do dia 49; já o GEp, que recebeu dieta hipoproteica do dia 0 ao 48, passou por uma recuperação nutricional, recebendo dieta normoproteica a partir do dia 49. Essa manipulação nutricional ocorreu até o final dos experimentos, que tiveram início aos 70 dias.

Figura 6: Gráfico de acompanhamento de peso (*eixo y*) do GC (---○---), do GEa (---□---) e do GEp (---▲---), do dia 28 ao dia 70 (*eixo x*).

A ANOVA para medidas repetidas aplicada aos dados obtidos (Tabela 5), mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre o peso para o fator grupo [$F(2,15)=167,12$; $p<0,05$], o fator dia de pesagem [$F(6,90)=1462,63$; $p<0,05$], e para interação entre os fatores [$F(12,90)=42,54$; $p<0,05$].

Tabela 5: Acompanhamento de peso dos ratos machos (Média, Desvio Padrão da Média e Erro Padrão da Média) do GC, GEa e GEp, do dia 28 ao dia 70

Dia de Pesagem	GC (N=6)			GEa (N=6)			GEp (N=6)		
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
28	80,67	5,24	2,14	80,67	4,59	1,87	35,17	2,86	1,17
35	136,00	11,71	4,78	123,33	5,28	2,16	54,83	4,31	1,76
42	190,17	13,14	5,36	177,00	7,56	3,09	72,83	4,58	1,87
49	236,83	15,78	6,44	225,50	9,33	3,81	86,50	7,87	3,21
56	274,83	15,66	6,39	237,00	16,20	6,61	131,83	6,62	2,70
63	312,83	16,92	6,91	255,00	27,24	11,12	177,00	7,92	3,24
70	346,50	19,85	8,10	280,83	31,76	12,97	209,17	11,02	4,50

O teste post hoc Tukey HSD mostrou que nos três grupos, houve aumento de peso significativo ($p<0,05$) a cada pesagem. Ou seja, no dia 35 o peso dos animais do GC, GEa e GEp, estava maior do que no dia 28; no dia 42 estava maior que no dia 35; no dia 49 estava maior que no dia 42; no dia 56 estava maior que no dia 49; no dia 63 estava maior que no dia 56; e no dia 70 estava maior que no dia 63.

O peso do GC e do GEa não teve diferença significativa ($p>0,05$) nas medidas até o dia 49, quando ambos estavam expostos a dieta normoproteica, porém, a na pesagem dos dias 56, 63 e 70, quando o GEa já estava exposto a dieta hipoproteica, houve diferença significativa entre o peso do GC e do GEa ($p<0,05$). O peso do GEp foi significativamente ($p<0,05$) menor do que o peso do GC e do GEp em todas as medidas.

6.1.3 - EQUIPAMENTO

O Labirinto de Imagens foi desenvolvido em parceria com a *Insight Ltda, Brasil*. Sua idealização se deu pela necessidade de um instrumento eficaz no acesso da visão em modelo animal. O olho do rato se tornou um modelo importante para pesquisas envolvendo visão (Schmucker et al., 2005). É possível medir com este equipamento, em roedores, a AV, SC, dentre outras medidas visuais, de maneira simples e objetiva.

Na literatura foram encontrados três métodos para se acessar comportamentalmente a AV em ratos: (a) uma modificação de um equipamento desenvolvido pela Coulbourn Instruments, USA (Keller, Strasburger, Cerutti & Sabel, 2000); (b) o *Visual Water Task* (Prusky, West & Douglas, 2000; Prusky, Harker, Douglas, Ian & Whishaw, 2002; Prusky & Douglas, 2003; Sklar, Iny, Heynen & Bear, 2001), desenvolvido por Prusky et al. (2000); (c) e o *Virtual Optokinetic System* (Douglas et al., 2005; Umino, Solessio & Barlow, 2008).

O primeiro (a) consiste em um equipamento com uma caixa de saída ou de largada para o rato, além de um segundo compartimento com um monitor de vídeo em sua extremidade. Nesse monitor de vídeo são apresentados seis estímulos visuais e o rato é condicionado a escolher o estímulo certo por meio de reforço com água. A escolha é considerada certa quando o animal toca seu nariz no estímulo certo, no caso o estímulo de teste; e é considerada errada quando o animal toca seu nariz em um dos outros cinco estímulos. Uma vez que o animal aprende a escolher o estímulo certo, é possível a realização de outros testes visuais. O grande problema desse equipamento é que não há controle da distância entre o animal e o estímulo visual no momento em que o animal toma a decisão por um dos estímulos, sendo permitido inclusive ao animal tocar seu nariz no estímulo. Para testes visuais, o controle da distância é de extrema

importância, visto que as características do estímulo variam com a distância, principalmente para os testes visuais mais tradicionais, como os de acuidade visual e de sensibilidade ao contraste.

O segundo (b) é baseado no labirinto aquático de Morris (Morris, 1981; Morris et al., 1982) e fundamentalmente é um tanque com água, em que de um lado, o animal é liberado dentro da água e do outro lado há dois monitores com estímulos visuais. Sempre na frente do estímulo de teste há uma plataforma submersa. O animal, ao começar a nadar, encontra uma divisória onde ele deve decidir o lado de qual monitor ele deseja seguir. Nessa distância, a plataforma submersa não é visível para o animal. Essa divisória é colocada para controlar a distância do animal até o monitor/estímulo visual, pois a escolha do animal é considerada certa ou errada no momento em que ele escolhe seguir por um dos lados. Esse método é o método da escolha forçada entre duas alternativas visuais. O que dificulta o uso desse equipamento é o fato de que no processo de condicionamento do animal, o reforço é encontrar a plataforma, ou seja, sair da água, pois ratos não são animais naturalmente nadadores, e para eles, a água é um estímulo extremamente estressor. Além de estresse ser uma variável interveniente que pode comprometer os resultados do experimento, há diversas outras condições, além da desnutrição, que são extremamente sensíveis ao estresse, como distúrbios psiquiátricos ou neurológicos, como depressão, esquizofrenia, epilepsia, mal de Parkinson ou Alzheimer.

O terceiro (c) consiste em uma câmara com uma realidade virtual cilíndrica rotatória, criada a partir de quatro monitores dispostos em forma de quadrado. O animal fica em uma pequena plataforma transparente no interior do equipamento, enquanto que ondas senoidais são projetadas no cilindro virtual rotatório. O experimentador julga se o rato ou camundongo fizeram pequenos movimentos de rastreamento com a cabeça ou

o corpo para seguir a grade giratória. Ou, seja, o momento em que o animal deixa de perceber o estímulo, ou o seu limiar, é medido por meio do método de “olhar preferencial”, o que além de não ser bem estabelecido em roedores, baseia-se no julgamento subjetivo do experimentador, que está sujeito a critérios individuais, como expectativa, atenção e outros fatores.

A primeira ideia para resolver todos esses problemas nos equipamentos já existentes, foi um equipamento (Figura 7) desenvolvido em parceria com o professor Dr. Natanael Antonio dos Santos, na Universidade Federal da Paraíba, o “Aparelho para Aferir a Capacidade Visual de Animais de Laboratório em Condições Diversas”. A patente deste instrumento (ANEXO V) foi publicada no dia 19/04/2011 (PI0903122-7 A2).

O equipamento era de controle manual e consistia basicamente em uma caixa de madeira com dois compartimentos. O primeiro era uma caixa de partida com porta móvel. O segundo compartimento era um espaço maior que possuía uma divisória em forma de V, delimitando a formação de uma passagem à direita e uma à esquerda, forçando o animal a escolher um dos lados para percorrer. Próximo ao final de ambos os caminhos, havia um bebedouro acionado manualmente, encoberto por um anteparo. No final dos dois lados havia sempre um bolso de acrílico para colocar manualmente um cartão com o estímulo visual de teste ou neutro.

A ideia era condicionar previamente o animal a escolher sempre o caminho sinalizado pelo estímulo de teste, utilizando um estímulo com uma frequência espacial conhecidamente acima do limiar visual do animal. Sempre que o animal escolhia o caminho certo, ele era reforçado com água liberada manualmente pelo experimentador. Após o condicionamento, seriam realizadas sessões variando o estímulo teste do nível supralimiar ao nível sublimiar para medidas de AV e SC.

Figura 7: Diagrama esquemático do aparelho para aferir a capacidade visual de animais de laboratório em condições diversas. (A) Primeiro compartimento. (B) Segundo compartimento.

Ao testar esse equipamento, verificou-se que algumas mudanças seriam necessárias para o seu funcionamento. Utilizar madeira na confecção do equipamento não era adequado, pois dificultava a limpeza. Outro problema era o caráter totalmente manual do equipamento. Da forma que foi idealizado inicialmente, o experimentador deveria manualmente abrir a porta do primeiro compartimento, reforçar o animal quando ele escolhesse o caminho sinalizado pelo estímulo teste, recolocar o animal no primeiro compartimento para cada nova tentativa, trocar os estímulos visuais, além de fazer o registro das respostas do animal.

Diante da necessidade de uma estrutura inovadora, capaz de suprir as necessidades experimentais de controle, simplicidade, aplicabilidade e objetividade, desenvolvemos o “Labirinto de Imagens” (Figura 8). Esse equipamento possui uma estrutura simples e leve, podendo ser deslocada para outros lugares conforme necessidade. O equipamento consiste basicamente em uma caixa de acrílico preta e

fosca por dentro (para evitar reflexos), com dois compartimentos. O primeiro compartimento é uma caixa de partida com porta móvel, medindo 27 cm de comprimento; 10 cm de largura e 33,5 cm de altura. Há dois sensores de presença dispostos dos dois lados da caixa de partida. O segundo compartimento é um espaço maior, medindo 53,5 cm de comprimento; 41 cm de largura e 33,5 cm de altura. O piso é composto por barras de aço inox, e uma gaveta de acrílico preto que pode ser retirada para limpeza.

Figura 8: Labirinto de Imagens visto de cima.

No compartimento maior, após 27 cm de distância da porta, há uma divisória que divide a caixa em dois lados, medindo 27 cm de comprimento, delimitando a formação de uma passagem à direita e uma à esquerda, forçando o animal a escolher um dos lados para percorrer. Na divisória e nas paredes da caixa na altura da divisória, há sensores de presença nos dois lados ligados ao bebedouro do lado correspondente.

Próximo ao final de ambos os caminhos, há um bebedouros com sensores de presença. Os bebedouros são encobertos por anteparos de 5 cm de altura e 5,25 cm de largura, formando um ângulo de 45° com a parede da caixa. No final de cada um dos dois lados há um servo com dois suportes móveis de acrílico transparentes contendo dois cartões, um com estímulo neutro e outro com estímulo visual de teste.

De um lado, há um estímulo cinza-homogêneo (estímulo neutro), enquanto que do outro lado, há uma grade linear vertical ou concêntrica (estímulo teste) com uma das 10 frequências espaciais, de 0,15 a 0,60 cpg, calibradas para serem vistas a 27 cm (distância do olho do rato ao centro do estímulo, no momento da escolha forçada), escolhidas de acordo com estudos que mostram que a acuidade visual cartesiana de ratos albinos *Wistar* se encontra nesta faixa (Keller et al., 2000; Prusky et al., 2002; Tejada & Tedó, 1998).

A caixa é conectada por cabo a uma caixa de controle, que tem o botão de liga/desliga, um cabo de energia 210 ou 220 volts, e um cabo com saída USB para conectar no computador. Um programa instalado no computador reconhece a caixa, recebe informações dos sensores de presença, registra as atividades do animal durante o experimento, controla a apresentação randômica dos estímulos visuais, a abertura da porta da caixa de partida e a liberação de água pelo bebedouro, além de gerar relatórios em Word e Excel de todas as respostas do animal.

6.1.4 - PROTOCOLO DE ANÁLISE COMPORTAMENTAL

O experimento visou o registro da AV e da SC visual, para estímulos em coordenadas cartesianas e polares, de ratos albinos *Wistar* com e sem desnutrição. Os experimentos tiveram início aos 70 dias de vida dos animais. Para início do

experimento, o experimentador verificava o ambiente (iluminação, temperatura, equipamento) e introduzia o animal no primeiro compartimento da caixa.

Antes do teste propriamente dito, houve uma fase de treinamento ao bebedouro, para que os animais pudessem operar na caixa. Nessa fase, quando o animal respondia corretamente, ativando os sensores de presença da divisória do lado correspondente ao estímulo de teste, o bebedouro era ativado e fazia um barulho, como um “tec”. Esse barulho foi importante para que o animal associasse o barulho do bebedouro à liberação de água (reforço). Para que a água exercesse caráter reforçador, os animais eram privados de água trinta horas antes do início dos experimentos. Ao fim do treino ao bebedouro, o próprio barulho assumisse um caráter reforçador.

Durante o condicionamento, cada vez que o animal entrava no corredor sinalizado pelo estímulo teste, ele ativava o bebedouro e era reforçado com água. Nessa primeira sessão, o objetivo era fazer o animal distinguir o estímulo teste, um círculo com uma frequência espacial (que estava associado ao reforço), de um círculo totalmente cinza – estímulo neutro. A frequência espacial de teste utilizada durante todo o condicionamento foi de 0,15 ciclos por grau de ângulo visual (cpg), uma frequência de fácil detecção por ratos (Keller et al., 2000; Prusky et al., 2002; Tejada & Tedó, 1998).

O protocolo utilizado seguiu o método psicofísico da entrada forçada com duas alternativas espaciais. Quando a porta móvel (que separava os compartimentos) se abria, o animal estava livre para passar para o segundo compartimento. Aos 15 cm do segundo compartimento, o animal chegava ao ponto de escolha forçada, se deparando com uma divisória que delimitava a formação de dois lados. Quando o animal seguia por um dos lados, o sensor de presença deste lado era ativado e caso esse lado fosse o lado sinalizado pelo estímulo de teste (inicialmente um círculo com frequência espacial de 0,15 cpg), a ativação desse sensor gerava a liberação de uma gota de água (reforço) pelo

bebedouro na extremidade do lado correspondente. Mas, caso esse lado fosse o lado sinalizado pelo estímulo neutro, ou seja, um círculo cinza, a ativação desse sensor não gerava a liberação de água pelo bebedouro do lado correspondente.

A apresentação dos estímulos era controlada pelo programa e variava randomicamente, de modo que em 50% das vezes, o estímulo de teste era apresentado no final do lado direito e em 50%, no final do lado esquerdo. A resposta do animal era considerada correta quando ele seguia pelo lado sinalizado pelo estímulo de teste e era considerada incorreta quando ele seguia o lado sinalizado pelo estímulo neutro (Figura 9).

Após a emissão da resposta pelo animal (correta ou não), o animal precisava voltar para o compartimento de partida para que os sensores do segundo compartimento ficassem ativos novamente. Nas primeiras tentativas, o experimentador recolocava o animal de no compartimento de partida, mas após algumas tentativas os animais retornavam sozinhos.

O animal ficava na caixa de partida durante 5 segundos, quando a porta se abria e o animal podia realizar uma nova tentativa. Esse procedimento foi repetido até o animal emitir uma taxa de respostas corretas maior ou igual a 90%.

Resposta Correta

Resposta Incorreta

Figura 9: Diagrama esquemático de resposta comportamental. O animal responde corretamente quando escolhe o caminho que leva ao estímulo teste (com as grades senoidais), sendo assim reforçado com água no bebedouro. Quando o animal responde incorretamente, ou seja, escolhe o caminho que leva até o estímulo cinza (neutro), encontra o bebedouro vazio, ficando sem reforço.

Após a fase de condicionamento, os experimentos para medida da AV tiveram início. O procedimento foi semelhante ao utilizado na fase de treinamento, porém os cartões com os estímulos visuais de teste variaram em relação à frequência espacial, sempre com contraste de 100%. A primeira frequência espacial utilizada foi de 0,15 cpg (utilizada na fase anterior), e a cada tentativa em que o animal emitia uma resposta correta, a frequência espacial do estímulo teste na próxima tentativa era aumentada em passos de 0,05 cpg, até um máximo de 0,60 cpg. A frequência espacial que foi considerada a AV de cada animal foi a última (maior frequência espacial) percebida por ele.

O procedimento para medir a SC visual dos animais também seguiu o mesmo protocolo do método psicofísico da escada com entrada forçada entre duas alternativas espaciais, porém a frequência espacial dos cartões era fixa e o contraste variava. Devido

a faixa estreita de frequências espaciais visíveis para ratos albinos *wistar*, utilizados no presente estudo, A SC foi medida somente para frequência espacial de 0,15 cpg, que foi a única frequência de teste visível por todos os animais de todos os grupos. O contraste começou em nível supralimiar (100%) e a cada acerto diminuía em passos de 5%, até o mínimo de 10% de contraste. A medida de limiar de contraste visual de cada animal foi a última quantidade de contraste detectada por ele. Em seguida, esse valor foi convertido para SC ($SC=1/\text{limiar de contraste}$).

6.2 – RESULTADOS

Durante a fase de condicionamento, em que era esperado que o animal detectasse uma grade de frequência espacial de 0,15 cpg, o critério de taxa de resposta igual, ou maior que 90%, só foi atingido para os estímulos em coordenadas cartesianas. Nenhum dos animais do GC, GEa, ou GEp conseguiu uma taxa de respostas corretas satisfatória para estímulos em coordenadas polares, apresentando uma taxa de acerto de cerca de 50%. Portanto, só os resultados para estímulos em coordenadas cartesianas foram considerados para o teste de AV e de SC, visto que como os animais não são capazes de detectar o estímulo polar, não é possível a realização de testes de sensibilidade ao contraste polar.

Após a fase de condicionamento, houve o teste de AV para estímulos em coordenadas cartesianas (Figura 10). A ANOVA One-way (de uma via) aplicada aos dados obtidos (Tabela 6), mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre a AV para o fator grupo [$F(2,15)=22,42$; $p<0,05$], e interação [$F(1,15)=502,99$; $p<0,05$].

Tabela 6: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da Acuidade Visual do GC, GEa e GEp

GC (N=6)			GEa (N=6)			GEp (N=6)		
Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
0,50*	0,08	0,03	0,48#	0,08	0,03	0,23*#	0,07	0,03

Legenda: O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o GC e os demais grupos, já a cerquilha (#) representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

O teste post hoc Tukey HSD mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a AV do GC ($0,5 \pm 0,08$) e do GEa ($0,48 \pm 0,08$) para estímulos cartesianos. Porém, a AV do GEp ($0,23 \pm 0,07$) foi significativamente ($p < 0,05$) menor do que a AV do GC e do GEa.

Figura 10: Acuidade Visual (*eixo y*) do GC, GEa e GEp (*eixo x*) para estímulos em coordenadas cartesianas. As barras de erro verticais denotam um intervalo de confiança de 95%. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o GC e os demais grupos, já a cerquilha (#) representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

O teste de Sensibilidade ao Contraste foi realizado para um estímulo em coordenadas cartesianas com frequência espacial de 0,15 cpg. O limiar de contraste para cada animal foi a última porcentagem de contraste detectada. Em seguida, foi calculada a SC (Tabela 7) para cada animal ($SC=1/\text{limiar de contraste}$).

Tabela 7: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da SC do GC, GEa e GEp

GC (N=6)			GEa (N=6)			GEp (N=6)		
Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
0,075	0,020*	0,008	0,030*	0,006	0,002	0,015*	0,002	0,001

Legenda: O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre o GC e os demais grupos.

A ANOVA One-way (de uma via) aplicada aos dados obtidos (ver Figura 11), mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre a SC cartesiana para frequência espacial de 0,15 cpg, para o fator grupo [$F(2,15)=38,08$; $p<0,05$], e interação [$F(1,15)=191,44$; $p<0,05$].

Figura 11: Gráfico de barra contendo a SC (*eixo y*) para o GC, GEa e GEp (*eixo x*). As barras de erro verticais denotam um intervalo de confiança de 95%. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o GC e os demais grupos.

O teste post hoc Tukey HSD mostrou que os grupos experimentais apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) na SC, quando comparados ao grupo controle. A SC do GC ($0,075 \pm 0,020$) foi maior do que a do GEa ($0,030 \pm 0,006$) e do que a do GEp ($0,015 \pm 0,002$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o GEa e o GEp.

6.3 – DISCUSSÃO

Modelos animais tem sido extensamente utilizados em pesquisas científicas por permitirem uma resposta aproximada à resposta humana (Conn & Parker, 2008) e a

maioria dos avanços científicos no campo da saúde se devem ao uso desses modelos (Miziara et. al., 2012). Para a realização de estudos científicos envolvendo a desnutrição, também é crescente o uso de modelos animais, já que eles permitem que uma série de verificações, que não poderiam ser realizadas em humanos, principalmente por questões éticas, sejam conduzidas. É possível destacar inúmeras vantagens em trabalhos envolvendo modelos animais, como (a) semelhança entre os sistemas neuronais de ratos e humanos (Izquierdo, 2002); (b) facilidade de controle de variáveis, (c) desenvolvimento de estudos que envolvem função cerebral e comportamento concomitantemente, (d) possibilidade e facilidade de indução da desnutrição, (e) custo menor em relação a pesquisas com humanos, (f) possibilidade de observar efeitos em longo prazo, já que o ciclo de vida e reprodutivo dos animais é rápido (Galler, Shumsky & Morgane, 1995).

Para o presente estudo, foram produzidos modelos de desnutrição proteica, por meio da manipulação da dieta pós-natal. A dieta hipoproteica utilizada, com 6% de proteína, ao invés de 16% (dieta adequada para ratos *wistar*), se baseou na dieta confeccionada manualmente pelo Laboratório de Nutrição e Comportamento da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, de textura parecida com uma farinha branca, já bem estabelecida na literatura (Almeida, Tonkiss & Galler, 1996a, 1996b, 1996c, 1996d). Nesse estudo, entretanto, optamos pela dieta confeccionada pela Rhoster (*Indústria e Comércio LTDA, Brasil*), devido à possibilidade de peletização, tornando-a mais natural ao consumo do animal.

O grupo controle (GC), tanto mãe quanto filhotes, consumiu dieta normoproteica desde o nascimento até a finalização dos testes. Simulamos a desnutrição atual (GEa), expondo a rata mãe, do dia do parto ao desmame, à desnutrição normoproteica (ver Figura 5), e os filhotes machos do 49º dia de vida ao final dos experimentos (ver Figura

6). O peso do GEa era bem semelhante ao peso do GC, porém a partir do 49º dia de vida, o peso do GEa começou a ficar progressivamente menor em comparação ao GC. Já para o modelo de desnutrição pregressa (GEp), a rata mãe foi exposta à dieta hipoproteica desde o momento do parto ao desmame (ver Figura 5) e os filhotes machos deste grupo continuaram recebendo dieta hipoproteica até o 49º dia, quando começaram a receber dieta normoproteica (Figura 6). O GEp apresentou peso bem inferior ao GC e ao GEa durante todo o período de experimentação. Apesar da recuperação nutricional iniciada aos 49 dias de vida (inserção da dieta normoproteica) ter diminuído essa diferença de peso, até a finalização dos experimentos o GEp ainda era bem menor e pesava menos do que os animais dos outros grupos.

Para os testes comportamentais, foi desenvolvido o Labirinto de Imagens (Figura 8), com o objetivo de medir, por meio de método psicofísico, a acuidade visual e a sensibilidade ao contraste de roedores. O processo de patente deste equipamento está em andamento pela Agência de Inovação da Universidade de São Paulo.

Os testes de padronização foram realizados em ratos albinos de linhagem *wistar*. Segundo mostraram os estudos de Prusky et al., (2002), a AV de ratos albinos para grades senoidais em coordenadas cartesianas é em média 0,5 cpg, enquanto que a AV de ratos pigmentados gira em torno de 1,11 cpg. A AV obtida com o equipamento utilizado nesse estudo, diferente do utilizado por Prusky et. al., (2002), o “visual water box”, foi semelhante, ficando em média 0,5 cpg, com desvio padrão de 0,08. Esses resultados indicam que o Labirinto de Imagens é eficiente para medir a AV de roedores para estímulos em coordenadas cartesianas.

Não foi possível a realização de testes de AV para estímulos em coordenadas polares, pois os animais não responderam de forma correta para nenhum dos estímulos polares utilizados nesse estudo. Não foram encontrados outros estudos que mediram a

AV para estímulos polares em ratos, sejam albinos ou pigmentados, assim não podemos afirmar se a AV dos ratos está em outra faixa de frequências espaciais menores do que as utilizadas neste estudo. A menor frequência espacial utilizada foi de 0,05 cp/g, então é possível que, a AV para ratos albinos *wistar* seja menor que 0,5 cp/g, ou que estes animais não sejam capazes de perceber estímulos em coordenadas polares. Diante dessa limitação, as medidas de sensibilidade ao contraste foram realizadas somente com estímulos em coordenadas cartesianas.

Nas análises que visaram verificar o efeito da desnutrição na AV para estímulos em coordenadas cartesianas, foram utilizados 18 ratos *wistar*, que compuseram três grupos, o controle (GC), desnutrido atual (GEa) e desnutrido pregresso (GEp), com seis animais cada. Os resultados mostraram que a desnutrição atual não prejudicou a AV dos ratos. Já os ratos com desnutrição pregressa apresentaram AV menor que a metade da AV do GC (ver Tabela 6). Essa diminuição na AV encontrada somente no GEp, pode se dever ao período de déficit nutricional nesse grupo, que foi submetido à dieta hipoproteica desde o nascimento até os 49 dias de vida, o que compreende o período crítico de desenvolvimento do cérebro em ratos (Dobbing, 1981), quando processos importantes e impactantes para o desenvolvimento acontecem. Prejuízos nutricionais nesse período, mesmo com recuperação nutricional, como acontece na desnutrição pregressa, podem acarretar uma série de prejuízos em todo o sistema visual, incluindo componentes neurais e óptico-refracionais.

Segundo Williams (1985) e Roorda e Williams (1998), as alterações na AV, na maioria das vezes, se devem a prejuízos refracionais, em decorrência de alterações nas lentes do olho ou na organização do mosaico de fotorreceptores retinianos. Estudos já associaram a desnutrição à diminuição da opacificação do cristalino (Bonavolonta et al.,

1989) e degeneração dos vacúolos da camada ganglionar da retina (Bonavolonta et al., 1991).

As medidas de SC para estímulos em coordenadas cartesianas, com frequência espacial de 0,15 cpg, indicaram que a desnutrição também prejudica o processamento neural da informação visual. Ao contrário da AV que só diminuiu no GEp, a SC diminuiu nos dois grupos experimentais. Os ratos com desnutrição atual e pregressa foram 2,5 e 5 vezes menos sensíveis para perceber contraste, respectivamente, que os ratos controle (ver Tabela 7). Esses resultados indicam que a desnutrição não afeta somente as estruturas visuais, mas prejudica também a função visual.

7 – EXPERIMENTO 3

7.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

7.1.1 - ANIMAIS

A utilização dos animais seguiu todos os parâmetros descritos no EXPERIMENTO 2, inclusive no que diz respeito às condições nutricionais. Foram utilizados 15 animais que não foram expostas à experimentação comportamental, sendo 5 constituindo o GC, 5 o GEa e 5 o GEp.

7.1.2 - PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Cinco animais de cada grupo foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina 0,9%, seguida de solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos e os globos oculares foram coletados e armazenados em

paraformaldeído 4% para pós-fixação durante 4 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em PB. Após 48 horas, a retina foi retirada e o córtex visual foi cortado em uma espessura de 30 µm em um micrótomo deslizante de congelamento (SM2000R, Leica). Os cortes histológicos foram colocados em placa de cultivo e mantidos em geladeira a 4°C até o momento do procedimento de imuno-histoquímica.

Para a obtenção de cortes transversais, as retinas foram incluídas em meio para congelamento (Triangle Biomedical Sciences; Durham, NC) e cortadas em plano transversal (12µm de espessura) em criostato, obtendo-se cortes de várias regiões retinianas em lâminas gelatinizadas. As lâminas permaneceram em placa aquecida a 37 °C por 30 minutos. Após este período estas foram mantidas a -20 °C para posterior reação.

A retina e os cortes do córtex visual foram selecionados e submetidos à metodologia de imuno-histoquímica com anticorpos específicos: (a) na retina: calbindina (C-8666 Sigma – Saint Louis, Mi) feito em camundongo com concentração de 1:2.000 (Milam et al., 1993) para detecção de células horizontais e amácrimas; parvalbumina (P3171Sigma – Saint Louis, Mi) feito em camundongo com concentração de 1:1.000, para detecção de células horizontais; calretinina (Ab5054 Sigma – Saint Louis, Mi) feito em coelho com concentração de 1:10.000, para as células bipolares e ganglionares; além de morfometria da retina para análise da espessura retiniana total e das camadas: nuclear externa, nuclear interna, plexiforme interna e camada ganglionar; (b) no córtex visual: Neu N (MAB377 Chemicon – Temecula, CA) para detecção de neurônios (Lind et al., 2005), na concentração 1:1000.

A realização da imuno-histoquímica se processou da seguinte forma: inicialmente os cortes foram submetidos a três lavagens de 10 minutos cada, em PB; b)

em seguida incubados “overnight” à temperatura ambiente, em solução incubadora, que continha PB-T (0,3% de Triton X-100), 5% de soro normal de cabra e anticorpo monoclonal primário específico, de acordo com a descrição acima; c) após período de incubação, os cortes foram submetidos a três lavagens de 10 minutos cada com PB; d) os cortes foram incubados durante duas horas à temperatura ambiente, com anticorpo secundário biotilado, diluído a 1:200 em PB contendo 0,3% de Triton X-100; e) após este período, submetidos a três lavagens de 10 minutos em PB; f) incubados novamente com um complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC-Elite, Vector, CA, USA) preparada com 10 µL da solução A e 10 µL da solução B por mL de PB contendo 0,3% de Triton X-100 e NaCl (0,3M – 0,5M) durante 1 hora e meia à temperatura ambiente; g) submetidos a três lavagens com PB durante 10 minutos cada.

A marcação com peroxidase foi realizada utilizando o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) dissolvido em PB durante 3 minutos, e em seguida foi adicionada uma solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio em água destilada. Após o desenvolvimento da cor, os cortes foram lavados três vezes com PB de 10 minutos cada. Os cortes foram então colocados sobre lâminas de vidro gelatinizadas e deixados por aproximadamente 24 horas em uma placa de aquecimento a 37° C para uma melhor adesão dos cortes nas lâminas. Em seguida, as lâminas foram deixadas por 5 minutos em água destilada e mergulhadas em uma solução de 0,05% de tetróxido de ósmio por aproximadamente 15 segundos para intensificação da marcação. Logo após, as lâminas foram submetidas a 3 lavagens de 10 minutos cada em PB e submetidas a uma bateria de desidratação, que consiste em uma série crescente de álcoois e por um solvente clareador (Hemo-De, Fisher, PA, USA) com duração de 5 minutos para cada estágio. As lâminas foram então cobertas com lamínulas usando Permount (Fisher, PA, USA) como

meio de montagem e analisadas em microscópio óptico acoplado a um sistema de análise de imagens baseado no programa NIH (USA).

7.2 – RESULTADOS

7.2.1 - ANÁLISE DAS RETINAS

A quantidade de células neurais por mm² da retina central (ver Figura 12) de cada animal foi contada e os valores foram agrupados em planilhas de acordo com a condição nutricional dos animais. Seis valores foram registrados para cada animal e a média desses seis valores, para cada animal, foi usada para a análise estatística.

Figura 12: Cortes transversais da retina de ratos adultos controle, com desnutrição atual (DA) e com desnutrição pregressa (DP) marcados por meio do método de imuno-peroxidase com calbindina (CB), calretinina (CR) e parvalbumina (PV). As legendas (à direita da imagem) indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), da camada plexiforme interna (IPL) e da camada das células ganglionares (GCL). Barra de escala = 60 μ m.

Para verificar diferenças estatisticamente significante entre os grupos (GC, GEa e GEp), utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, visto que há apenas uma variável independente (fator categórico): a condição nutricional. Quando houve diferença entre os grupos e/ou mais de uma variável dependente, realizou-se o pós-teste Tukey HSD, para verificar entre quais grupos e para quais variáveis houve diferenças estatisticamente significantes.

A ANOVA aplicada aos dados de quantidade de células horizontais e amácrimas, obtidos por meio da marcação com Calbindina, mostrou que não há diferença significativa entre os grupos [$F(2,51)=0,04;p>0,05$], nem interação grupos *versus* variáveis dependentes [$F(2,51)=0,12;p>0,05$], o que torna desnecessária a realização de pós-teste (ver Tabela 8 e Figura 13).

Tabela 8: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da Quantidade de Células Horizontais e Amácrimas por mm², marcadas com Calbindina, para GC, GEa e GEp

Células	GC (N=5)			GEa (N=5)			GEp (N=5)		
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Horizontais	35,93	9,74	2,30	36,67	8,63	2,03	37,04	8,31	1,96
Amácrimas	142,96	21,60	5,09	140,37	27,96	6,59	140,00	19,67	4,64

Figura 13: Quantidade de Células Horizontais e Amácrimas por mm² (*eixo y*) na retina central do GC, GEa e GEp (*eixo x*), obtida por meio de marcação com Calbindina. As barras de erro verticais equivalem à média $\pm$ o erro padrão da média, com intervalo de confiança de 95%. Não há diferenças significantes entre os grupos ($p > 0,05$).

A ANOVA aplicada aos dados de quantidade de células horizontais, obtidos por meio da marcação com Parvalbumina, mostrou que não há diferença significativa entre os grupos [$F(2,51)=0,84; p > 0,05$], como só houve uma variável dependente (quantidade de células horizontais, foi desnecessária a realização de pós-teste (ver Tabela 9 e Figura 14).

Tabela 9: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da Quantidade de Células Horizontais por mm², marcadas com Parvalbumina para GC, GEa e GEp.

	GC (N=5)			GEa (N=5)			GEp (N=5)		
Células	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Horizontais	206,67	22,64	5,34	204,44	27,34	6,45	215,93	33,30	7,85

Figura 14: Quantidade de Células Horizontais por mm² (*eixo y*) na retina central do GC, GEa e GEp (*eixo x*), obtida por meio de marcação com Parvalbumina. As barras de erro verticais equivalem à média $\pm$ o erro padrão da média, com intervalo de confiança de 95%. Não há diferenças significantes entre os grupos ($p > 0,05$).

A ANOVA aplicada aos dados de quantidade de células bipolares e ganglionares por mm², obtidos por meio da marcação com Calretinina, mostrou que não há diferença significativa entre os grupos [$F(2,51)=0,11; p > 0,05$], nem interação grupos *versus* variáveis dependentes [$F(2,51)=0,62; p > 0,05$], o que torna desnecessária a realização de pós-teste (ver Tabela 10 e Figura 15).

Tabela 10: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da Quantidade de Células Bipolares e Ganglionares por mm², marcadas com Calretinina, para GC, GEa e GEp

Células	GC (N=5)			GEa (N=5)			GEp (N=5)		
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Bipolares	139,63	28,60	6,74	138,52	21,40	5,04	144,07	24,43	5,76
Ganglionares	75,56	14,64	3,45	72,22	18,89	4,45	69,26	14,31	3,37

Figura 15: Quantidade de Células Bipolares e Ganglionares por mm² (*eixo y*) na retina central do GC, GEa e GEp (*eixo x*), obtida por meio de marcação com Calretinina. As barras de erro verticais equivalem à média $\pm$ o erro padrão da média, com intervalo de confiança de 95%. Não há diferenças significantes entre os grupos ($p > 0,05$).

A ANOVA aplicada aos dados de morfometria da retina para análise da espessura retiniana total e das camadas: nuclear externa (ONL), nuclear interna (INL), plexiforme interna (IPL) e camada ganglionar (GCL), não mostrou diferença

significante entre os grupos [$F(2,51)=1,13$; $p>0,05$], nem interação significante grupos *versus* variáveis dependentes [$F(8,51)=1,26$; $p>0,05$] (ver Tabela 11), o que torna desnecessária a realização de pós-teste.

Tabela 11: Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da espessura retiniana total e das camadas: ONL, INL, IPL e GCL para GC, GEa e GEp

	GC (N=5)			GEa (N=5)			GEp (N=5)		
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Total	155,33	8,00	1,89	153,94	6,09	1,44	151,72	7,42	1,75
ONL	57,16	2,74	0,65	56,59	2,46	0,58	56,06	2,71	0,64
INL	43,44	2,15	0,51	43,25	1,74	0,41	42,46	2,04	0,48
IPL	58,12	2,99	0,71	57,69	2,55	0,60	56,43	2,88	0,68
GCL	14,11	0,92	0,22	14,36	0,85	0,20	14,17	0,73	0,17

Figura 16: Espessura retiniana (*eixo y*) total e por camada: ONL, INL, IPL e GCL, para o GC, GEa e GEp (*eixo x*). As barras de erro verticais equivalem à média $\pm$ o erro padrão da média, com intervalo de confiança de 95%. Não há diferenças significantes entre os grupos ($p > 0,05$).

7.2.2 – ANÁLISE DO CÓRTEX VISUAL

A amostra utilizada para análise do córtex visual foi apenas de 3 sujeitos em cada grupo, sendo 5 medidas para cada sujeito. Foi realizada uma análise de áreas de $40.000 \mu\text{m}^2$ abrangendo o córtex visual primário e secundário (V1 e V2), onde, visualmente parecia haver uma diferença. A ferramenta integrada de densidade do ImageJ (NIH) foi utilizada para análise quantitativa dos dados.

Os resultados relativos da análise de densidade de neurofilamentos, obtidas por meio de marcação com PAN, foram de $100\% \pm 4$ para o GC, $86\% \pm 8$ para o DA, e 67 ± 5 para o DP (Figura 17).

Figura 17: Cortes transversais do córtex visuo-sensorial primário de ratos adultos controle, com desnutrição atual (DA) e com desnutrição pregressa (DP) marcados com PAN (marcador de neurofilamentos) por meio do método de imuno-peroxidase. Barra de escala = 100 μ m.

Infelizmente, devido ao tamanho da amostra, não foi possível a realização de análises estatísticas. Já os resultados da análise de densidade de neurônios, obtidos por meio de marcação com NeuN, não mostraram diferenças visíveis ou quantificáveis.

7.2.3 – DISCUSSÃO

Quinze animais participaram do EXPERIMENTO III, e compuseram os 3 grupos, sendo 5 do grupo controle (GC ou Controle), 5 do grupo experimental com desnutrição atual (GEa ou DA) e 5 do grupo experimental com desnutrição pregressa (GEp ou DP). Os animais foram sacrificados aos 70 dias de vida e foram imediatamente submetidos ao protocolo de imunohistoquímica. A amostra utilizada passou pelas mesmas condições nutricionais do EXPERIMENTO II, porém foram utilizados animais diferentes neste experimento.

O tratamento estatístico (ANOVA) não mostrou diferenças significantes ($p > 0,05$) na comparação entre GEa e GEp *versus* o GC quanto à quantidade de células retinianas (horizontais, bipolares, amácrimas e ganglionares) contadas por camada e por mm^2 da retina central, independentemente do anticorpo utilizado (calbindina, parvalbumina ou calretretinina). Esse critério estatístico é motivo suficiente para descartarmos a diferença e considerarmos os grupos iguais (Figuras 13, 14 e 15) quanto aos parâmetros medidos, sem a necessidade da realização de um *post test* ou outras análises estatísticas. Uma análise descritiva dos valores médios obtidos pelos grupos (ver Tabela 9, 10 e 11) mostra que os valores são praticamente iguais. Considerando os valores médios do GC como sendo 100%, a diferença quanto à contagem de células por mm^2 não ultrapassou 5%.

Na morfometria, foi analisada a espessura retiniana, total e por camada (ver Figura 16 e Tabela 12). A ANOVA, aplicada aos dados de espessura, não mostrou diferença significativa entre os grupos, nem interação significativa. A espessura total da retina do GC ($155,33 \pm 8,00$) não foi diferente da espessura retiniana dos grupos experimentais, GEa ($153,94 \pm 6,09$) e GEp ($151,72 \pm 7,42$).

Quanto à análise histológica do córtex visual primário e secundário, os resultados sugerem uma diminuição na densidade de neurofilamentos nos grupos com desnutrição, principalmente no caso da desnutrição pregressa. Essa possível perda estrutural de neurônios visuo-sensoriais corticais não foi revertida no GEp pela recuperação nutricional com administração de dieta normoproteica a partir do 49º dia de vida.

Como o presente estudo avaliou o efeito da desnutrição proteica atual e pregressa em modelo animal com análise histológica da retina e do córtex visual, não é possível compararmos os resultados encontrados com os resultados de pesquisas que

avaliaram os efeitos da baixa ingestão de outros nutrientes além da proteína, ou em outros componentes do sistema visual. Por exemplo, o estudo de Almeida et al. (2005), avaliou o efeito de uma dieta multideficiente, conhecida como “dieta básica regional”, semelhante qualitativamente e quantitativamente com a dieta consumida pela população rural no nordeste brasileiro (Teodósio et al., 1990), nas células ganglionares. Porém, diferentemente do presente estudo que avaliou o soma das células ganglionares na camada ganglionar retiniana, Almeida et al. (2005), avaliou o axônio das células ganglionares que compõem o nervo óptico, encontrando perdas na quantidade, diâmetro e mielinização das fibras.

Já o estudo de Bedi e Warren (1983), apesar de ter utilizado desnutrição proteica, avaliou o nervo óptico, assim como Almeida et al. (2005), encontrando diminuição na espessura e na mielinização relacionadas à baixa ingestão de proteína. A pesquisa de Buchanan e Roberts (1948) mostrou prejuízos semelhantes aos encontrados por Almeida et al. (2005) e por Bedi e Warren (1983), porém no trato óptico.

Foram encontrados diversos estudos que avaliaram o efeito da privação de certos nutrientes na retina (Uauy et al., 2003; Morale et al., 2005; Berseth et al., 2011), porém até o momento só o estudo de Bonavolonta et al. (1989) avaliou o efeito da desnutrição proteica pregressa em ratos, encontrando danos nas lentes oculares reversíveis com recuperação nutricional, e, degeneração dos vacúolos da camada ganglionar, redução dos microtúbulos e proliferação glial, que se mostraram irreversíveis, apesar da observação de alguma melhora após recuperação nutricional.

Essas alterações estruturais encontradas na camada ganglionar de ratos desnutridos (Bonavolonta et al., 1989, 1991) não foram encontradas na amostra utilizada no presente estudo, o que pode se dever, em parte, ao Bonavolonta et al. (1989 e 1991) ter submetido os animais à desnutrição fetal, quando acontecem processos

importantes, como a gliogênese e a diferenciação e especialização glial. Alterações nesse período podem ocasionar diversos prejuízos ao sistema nervoso central e periférico, visto que as diferentes populações de células gliais são responsáveis por funções importantes, como por exemplo, os astrócitos que são responsáveis pela modulação do ambiente químico neural; os oligodendrócitos que participam da produção de mielina, importante facilitador da condução elétrica dos neurônios no sistema nervoso central; as células de Schwann, que tem função semelhante aos oligodendrócitos, porém atuam no sistema nervoso periférico; as micróglia que tem ação importante no reconhecimento e fagocitose de antígenos, protegendo o sistema nervoso central (Baumann & Hauw, 1979). Além da diferença no período do insulto nutricional, visto que no presente estudo a desnutrição foi pós-natal, o nível de análise do estudo de Bonavolonta et al. (1989 e 1991) foi celular, e não somente histológico como na presente análise.

Provavelmente, a diferença expressiva encontrada nos animais desnutridos por meio de testes comportamentais, se deva a alterações em outros processos não analisáveis com a abordagem deste estudo, como diminuição no número de sinapses, diminuição da arborização dendrítica, alterações na expressão de neurotransmissores, menor quantidade de DNA, entre outros (Morgan & Naismith, 1982; Zamenhof, 1991; Almeida et al., 2001). É importante a realização de novos estudos com técnicas mais rebuscadas capazes de analisar principalmente as estruturas intracelulares.

8 – CONCLUSÃO

Já eram esperadas diminuições na AV e SC relacionadas à desnutrição, visto que a literatura mostra prejuízos funcionais e estruturais no cérebro (Galler et al. 1996;

Levitsky & Strup, 1995; Scrimshaw, 1998); e no sistema visual (Bedi et al., 1983,1989; Bonavolonta et al., 1989; 1991; Diaz-Cintra et al., 1990; Gundappa & Desiraju, 1988) de animais e humanos desnutridos. Estudos recentes também corroboram com esses achados, mostrando alterações eletrofisiológicas na visão de lactentes e crianças em idade pré-escolar com desnutrição (Dantas et al., 2005; McDonald et al., 2007; Thordstein et al., 2004).

Os resultados encontrados sugerem que a avaliação da SC, para estímulos em coordenadas cartesiana e polar, pode ajudar no estabelecimento de um padrão bem caracterizado dos efeitos da desnutrição no desenvolvimento do sistema visual, além de contribuir no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento do tratamento de crianças com desnutrição atual ou pregressa. Portanto, futuras pesquisas fisiológicas e psicofísicas na visão da forma devem se beneficiar com o uso de estímulos complexos ao invés do uso restrito de grades senoidais convencionais (Wilkinson et al., 2000).

O Labirinto de Imagens se mostrou eficiente para medir a AV e SC em ratos por meio de método psicofísico. Os resultados com animais corroboraram com os achados em humanos e indicaram prejuízo nos grupos desnutridos, principalmente referente à desnutrição pregressa, mesmo após recuperação nutricional. Não foi possível realizar testes animais com estímulos em coordenadas polares, possivelmente porque a área visual no cérebro do rato é menos desenvolvida que no cérebro de humanos e provavelmente eles não são sensíveis a estímulos em coordenadas não-cartesianas.

As análises histológicas da retina, ao contrário do que se esperava, não mostraram diferenças entre os grupos, possivelmente devido ao nível de análise. É possível que os efeitos da desnutrição sejam mais facilmente medidos bioquimicamente por meio de métodos capazes de análises mais microscópicas.

Esse foi o primeiro estudo, até o momento, que integrou medidas comportamentais e bioquímicas, em humanos e em modelo animal, para o estudo do efeito de dois tipos comuns de desnutrição, a atual e a pregressa, no sistema visual. Esse tipo de análise integrada possibilita uma maior compreensão acerca da importância da nutrição adequada, em especial do consumo de proteína, para o desenvolvimento do sistema nervoso e do sistema visual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R. J. & Courage, M. L. (2002). Using a single test to measure human contrast sensitivity from early childhood to maturity. *Vision Research*, 42, 1205–1210.
- Akutsu, H. S., & Legge, G. E. (1995). Discrimination of compound gratings: Spatial-frequency channels or local features? *Vision Research*, 35, 2685-2695.
- Alencar, C.C.G & Santos, N.A. (2012). Early malnutrition decreases contrast sensitivity to circular concentric gratings. *Psychology & Neuroscience*, 5, 3-9.
- Allen, L. H. (1993). The nutrition CRSP: what is marginal malnutrition and does it affect human function? *Nutrition Reviews*, 51, 255-267.
- Almeida, S. S., Tonkiss, J. & Galler, J. R. (1996a). Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 20, 389-402.
- Almeida, S. S., Tonkiss, J. & Galler, J. R. (1996b). Prenatal protein malnutrition affects the social interactions of juvenile rats. *Physiology & Behavior*, 60, 197-201.
- Almeida, S. S., Tonkiss, J. & Galler, J. R. (1996c). Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plusmaze test. *Physiology & Behavior*, 60, 675-680.
- Almeida, S. S, Tonkiss, J. & Galler, J. R. (1996d). Prenatal protein malnutrition affects avoidance but not escape behavior in the elevated T-maze test. *Physiology & Behavior*, 60, 191-195.
- Almeida, M. F. L., Yamasaki, E. N., Silveira, A. C. D., Guedes, R. C. A., Hokoc, J. N. (2001). The GABAergic and cholinergic systems in the retina are differentially affected by postnatal malnutrition during the suckling period. *Nutritional Neuroscience*, 4, 223–238.

- Almeida, M. F. L., Silveira, A. C. D., Guedes, R. C. A., Hokoc, J. N. & Martinez, A. M. B. (2005). Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted to a multideficient diet. *Nutritional Neuroscience*, 8 (2), 91-99.
- Andrade, J. P., Madeira, M. D., Paula-Barbosa, M. M. (1995a). Evidence of reorganization in the hippocampal mossy fiber synapses of adult rats rehabilitated after prolonged undernutrition. *Experimental Brain Research*, 104, 249-61.
- Andrade, J. P., Madeira, M. D. & Paula-Barbosa, M. M. (1995b). Effects of longterm malnutrition and rehabilitation on the hippocampal formation of the adult rat. A morphometric study. *Journal of Anatomy*, 187, 379-393.
- Andrade, J. P., Madeira, M. D. & Paula-Barbosa, M. M. (1998). Differential vulnerability of the subiculum and entorhinal cortex of the adult rat to prolonged protein deprivation. *Hippocampus*, 8, 33-47.
- Artal, P., Ferro, M., Miranda, I. & Navarro, R. (1993). Effects of aging in retinal image quality. *Journal of the Optical Society of America*, 10, 1656-1662.
- Bailey, E. L., Overstreet, D. N. & Crocer, A. D. (1986). Effects of intrahippocampal injections of the cholinergic neurotoxin AF64A on open-field activity and avoidance learning in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 45, 263-74.
- Barnes, R. H., Nelly, C. S., Kwong, E., Labadan, B. A. & Frankova, S. (1968). Postnatal nutrition deprivations as determinants of adult rats behavior toward food, its consumption and utilization. *Journal of Nutrition*, 96, 467-476.
- Barnes, R. H., Cunnold, S. R., Zimmermann, R. R., Simmons, H., MacLeod, R. B. & Krook, L. (1996). Influence of nutritional deprivations early in life on learning behavior of rats as measured by performance in a water maze. *Journal of Nutrition*, 89, 399-410.

- Baumann, N. & Hauw, J. J. (1979). Review on the properties of glial cells of the central nervous system. *Sem Hop*, 55(35-36), 1653-1661.
- Bedi, K. S. & Warren, M. A. (1983). The effects of undernutrition during early life on the rat optic nerve fiber number and size-frequency distribution. *The Journal of Comparative Neurology*, 219, 125-132.
- Bedi, K. S. (1984). The effects of undernutrition on brain morphology. A critical review of methods and results. In: Jones, D.G. (Ed.), *Current Topics in Research on Synapses*, 93-163.
- Bedi, K. S. (1987). Lasting neuroanatomical changes following undernutrition during early life. In: Dobbing, J. (Ed.), *Early Nutrition and Later Achievement*. *Academic Press*, 1-49.
- Bedi, K., Warren, M. A. (1988). Effect of nutrition on cortical development. In: Jones, E.G., Peters, A. (Eds.), *Cerebral Cortex: Development and Maturation of Cerebral*, 441-478.
- Bedi, K. S., Massey, R. F. & Smart, J. L. (1989). Neuronal and synaptic measurements in the visual cortex of adult rats after undernutrition during normal or artificial rearing. *The Journal of Comparative Neurology* 289, 89-98.
- Bedi, K. S. (1991). Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 311, 425-33.
- Bedi, K. S. (1992). Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. *Physiology & Behavior*. 51 (5), 1001-1007.
- Benítez-Bribiesca, L., Rosa-Alvarez, Irma De la. & Mansilla-Olivares, A. (1999). Dendritic Spine Pathology in Infants with Severe Protein-Calorie Malnutrition. *Pediatrics*, 104 (2), 1-6.

- Berseth, C.L., Mitmesser, S.H., Birch, E.E., Khoury, J.C., Bean, J., Harris, C.L. & Scalabrin, D.M. (2011). Intake of DHA/ARA via breast milk or formula supplementation during infancy can impact the incidence and recurrence of allergic manifestations in young children. *Hepatology and Nutrition*.
- Birch, D.G., Birch, E.E., Hoffman, D.R. & Uauy, R.D. (1992). Retinal development in very-lowbirth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 33, 2365-76.
- Black, R., Morris, S., & Bryce, J. (2003). Where and why are 10 million children dying every year? *The Lancet*, 361, 2226-2234.
- Bonavolonta, O., Ferrante, P., & Rosati, G. (1989). Retinal and lens damages observed in young rats undergoing protein malnutrition at selected stages of their growth. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 59, 117-121.
- Bonavolonta, O., Ferrante, P., Terracciano, L., & Vecchione, R. (1991). Further researches about retinal damages and dietary protein imbalance in growing rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 61, 251-257.
- Bour, L. J. & Apkarian, P. (1996). Selective broad-band spatial frequency loss in contrast sensitivity functions. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 37(12), 2475-2484.
- Brown, R. E. (1966). Organ weight in malnutrition with special reference to brain weight. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 8, 512-522.
- Buchanan, A. R. & Roberts, J. E. (1948). Relative lack of myelin in optic tracts as result of underfeeding in the young albino rat. *The Society for Experimental Biology and Medicine*, 69, 101-104.
- Campbell, L. F. & Bedi, K. S. (1989). The effects of undernutrition during early life on spatial learning. *Physiology & Behavior*, 45, 883-890.

- Campbell, F. W., & Green, D. G. (1965). Optical and retinal factors affecting visual acuity. *Journal of Physiology*, 181, 576-593.
- Campbell, F. W., & Robson, F. G. (1968). Application of the Fourier analysis to the visibility of gratings. *Journal of Physiology*, 197, 551-566.
- Candy, T. R., Crowell, J. A. & Banks, M. S. (1998). Optical, receptor, and retinal constraints on foveal and peripheral vision in the human neonate. *Vision Research*, 38, 3857–3870.
- Carughi, A., Carpenter, K. J. & Diamond, M. C. (1989). Effect of environmental enrichment during nutritional rehabilitation on body growth, blood parameters and cerebral cortical development of rats. *Journal of Nutrition*, 119, 2005-2016.
- Castro, C. A. & Rudy, J. W. (1987). Early-life malnutrition selectively retards the development of distal- but not proximal-cue navigation. *Developmental Psychobiology*, 20, 521-537.
- Castro, C. A., Tracy, M. & Rudy, J. W. (1989). Early life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory processes mediating performance in a conditional-spatial discrimination task. *Behavioural Brain Research*, 32, 255-264.
- Castro, C. A. & Rudy, J. W. (1993). Impaired short-term memory resulting from postnatal undernutrition is attenuated by physostigmine. *Behavioral and Neural Biology*, 60, 282-285.
- Caulfield, E. L., Onis, M., Blössner, M. & Black, R. E. (2004). Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles – *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 193-198.
- Celedon, J. M. & Colombo, M. (1979). Effects of chlordiazepoxide on maze performance of rats subjected to undernutrition in early life. *Psychopharmacology*, 63, 29-32.

- Chiu, F. C., Feng, L., Chan, S. O., Padin, C. & Federoff, H. J. (1995). Expression of neurofilament proteins during retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Molecular Brain Research*, 30, 77-86.
- Cintra, L., Diaz-Cintra, S., Galvan, A., Kemper, T. & Morgane, P. J. (1990). Effects of protein undernutrition on the dentate Gyrus in rats of three age groups. *Brain Research*, 532, 271-277.
- Cordoba, N. E., Arolfo, M. P., Brioni, J. D. & Orsingher, O. A. (1994). Perinatal undernutrition impairs spatial learning in recovered adult rats. *Acta physiologica, pharmacologica et therapeutica latinoamericana*, 44, 70-76.
- Conn, P.M. & Parker, J. V. (2008). The animal research wars. *Skeptic Magazine*, 13(4), 19-20.
- Cornsweet, T. N. (1970). *Vision Perception*. New York: Academic Press.
- Cragg, B. G. (1972). The development of cortical synapses during starvation in the rat. *Brain*, 95, 143-150.
- Dantas, A. P., Brandt, C. T. & Leal, D. N. B. (2005). Manifestações oculares em pacientes que tiveram desnutrição nos primeiros seis meses de vida. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, 68 (6), 753-756.
- David, S.V., Hayden, B. Y. & Gallant, J. L. (2006). Spectral Receptive Field Properties Explain Shape Selectivity in Area V4. *Journal of Neurophysiology*, 96, 3492-3505.
- DeValois, R. L. & DeValois, K. K. (1988). Spatial vision. *Annals Review of Psychology*, 31, 309-341.
- Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Ortega, A., Kemper, T. & Morgane, P. J. (1990). Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. *The Journal of Comparative Neurology*, 292, 117-26.

- Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Galvan, A., Aguilar, A., Kemper, T. & Morgane, P. J. (1991). Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *The Journal of Comparative Neurology*, 310, 356-364.
- Diaz-Cintra, S., Garcia-Ruiz, M., Corkidi, G. & Cintra, L. (1994). Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Research*, 662, 117-126.
- Diaz-Cintra, S., González-Maciel, A., Morales, M. A., Aguilar, A., Cintra, L. & Prado-Alcalá, R.A. (2007). Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1–3 subfields of the dorsal hippocampus. *Experimental Neurology*, 208, 47-53.
- Dobbing, J., Hopewell, J. W. & Lynch, A. (1971). Vulnerability of developing brain. VII. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. *Experimental Neurology*, 32, 439-47.
- Dobbing, J. (1981). The later development of the brain and its vulnerability. In: Davies, J.A., Dobbing, J. (Eds.), *Scientific Foundations of Paediatrics*, 744-759.
- Dobbing, J. (1990). Early nutrition and later achievement. *Proceedings of the Nutrition Society*, 49, 103-118.
- Dobson, V. & Teller, D. Y. (1978). Visual Acuity in Human Infants: A Review and Comparison of Behavioral and Electrophysiological Studies. *Vision Research*, 18, 1469-1483.
- Douglas, R. M., Alam, N. M., Silver, B. D., McGill, T. J., Tschetter, W.W. & Prusky, G. T. (2005). Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system. *Visual Neuroscience*, 22, 677-684.

- Dunbar, G. L., Rylett, R. J., Schmidt, B. M., Sinclair, R.C. & Williams, L. R. (1993). Hippocampal choline acetyltransferase activity correlates with spatial learning in aged rats. *Brain Research*, 604, 266-72.
- Durmaz, L., Karagöl, U., Deda, G. & Zulkufönl, M. (1999). Brainstem auditory and visual evoked potentials in children with protein-energy malnutrition. *Pediatrics International*, 41, 615–619.
- Elliott, D. B. & Situ, P. (1998). Visual acuity versus letter contrast sensitivity in early cataract. *Vision Research*, 38, 2047-2052.
- Engsner, G., Belete, S., Sjogren, I. & Vahlquist, B. (1974a). Brain growth in children with marasmus. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 79, 116-128.
- Engsner, G., Hobte, D., Sjogren, I. & Vahlquist, B. (1974b). Brain growth with Kwashiorkor. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 62, 687-694.
- Falbo, A. R. & Alves, J. G. B. (2002). Desnutrição grave: alguns aspectos clínicos e epidemiológicos de crianças hospitalizadas no Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP), Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 18 (5), 1473-1477.
- File, S. E., Gonzalez, L. E. & Andrews, N. (1998). Endogenous acetylcholine in the dorsal hippocampus reduces anxiety through actions on nicotinic and muscarinic1 receptors. *Behavioral Neuroscience*, 112, 352-359.
- Gallant, J.L., Braun, J. & Van Essen, D.C. (1993). Selectivity for polar, hyperbolic, and Cartesian gratings in macaque visual cortex. *Science*, 259, 100-103.
- Gallant, J.L., Connor, C.E., Rakshit, S., Lewis, J.W. & van Essen, D.C. (1996). Neural responses to polar, hyperbolic, and Cartesian gratings in area V4 of the macaque monkey. *Journal of Neurophysiology*, 76, 2718-39.

- Galler, J. R., Ramsey, F., Solimano, G. & Lowell, W. E. (1983). The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development, II: classroom behavior. *The Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 22, 16-22.
- Galler, J. R. & Ramsey, F. (1989). A follow-up study of the influence of early malnutrition on development: behavior at home and at school. *The Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 28, 254-261.
- Galler, J. R., Ramsey, F., Morley, D. S., Archer, E. & Salt, P. (1990). The long-term effects of early kwashiorkor compared with marasmus, IV: performance on the national high school entrance examination. *Pediatric Research*, 28, 235-239.
- Galler, J. R., Shumsky, J. S. & Morgane, P. J. (1996). Malnutrition and Brain Development. Em: Walker, W. A. e Watkins, J. eds. *Nutrition in Pediatrics*, 2, 194-210.
- Galler, J. R. (2001). Children and famine: long term effects on behavioral development. *Ambulatory Child Health*, 7, 85-95.
- Galler, J. R. & Ramsey, F. (2006). A follow-up study of the influence of early malnutrition on development: behavior at home and at school. *The Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 22, 16-22.
- Geinisman, Y., deToledo-Morrell, L., Morrell, F. & Heller, R. E. (1995). Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Progress in Neurobiology*, 45, 223-52.
- Goodlett, C. R., Valentino, M. L., Morgane, P. J. & Resnick, O. (1986). Spatial cue utilization in chronically malnourished rats: task-specific learning deficits. *Developmental Psychobiology*, 19, 1-15.

- Grantham-McGregor, S., Schofeld, W. & Powell, C. (1987) Development of severely malnourished children who received psychosocial stimulation: six-year follow-up. *Pediatrics*, 79, 247-254.
- Grantham-McGregor, S. (1995) A review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development. *Journal of Nutrition*, 125, 2233-2238.
- Guedes, R. C. A., Rocha-de-Melo, A. P. & Teodósio, N. R. (2004). Nutrição Adequada: A Base do Funcionamento Cerebral. *Ciência e Cultura*, 56, 32-35.
- Gundappa, G. & Desiraju, T. (1988). Deviations in brain development of F2 generation on caloric undernutrition and scope of their prevention by rehabilitation: alterations in dendritic spine production and pruning of pyramidal neurons of lower laminae of motor cortex and visual cortex. *Brain Research*, 456, 205-223.
- Hall, R. D. (1983). Is hippocampal function in the adult rat impaired by early protein or protein-calorie deficiencies? *Developmental Psychobiology*, 16, 395-411.
- Hedge, J. & Van Essen, D.C. (2003). Strategies of shape representation in macaque visual area V2. *Visual Neuroscience*, 20, 313-328.
- Hedge, J. & Van Essen, D. C. (2007). A Comparative Study of Shape Representation in Macaque Visual Areas V2 and V4. *Cerebral Cortex*, 17, 1100-1116.
- Hoffman, D.R., Uauy, R., Birch, E.E., Birch, D.G. (1993). Effects of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on retinal and cortical development in premature infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 807-12.
- Izquierdo, I. (2002). Memória. Porto Alegre: Artmed.
- Jackson, C. M. & Stewart, C. A. (1920). The effects of inanition in the young upon the ultimate size of the body and the various organs in the albino rat. *Journal of Experimental Zoology*, 30, 97-128.

- Jessa, M., Nazar, M., Stefanski, R. & Plaznik, A. (1996). The hippocampus — the key structure in processing of emotional input in the central nervous system. *ACTA Physiologica Hungarica*, 84, 419-20.
- Jordan, T. C., Cane, S. E. & Howells, K. F. (1981). Deficits in spatial memory performance induced by early undernutrition. *Developmental Psychobiology*, 14, 317-325.
- Jordan, T. C., Howells, K. F., McNaughton, N. & Heatlie, P. L. (1982). Effects of undernutrition on hippocampal development and function. *Research in Experimental Medicine*, 180, 201-207.
- Keller, J., Strasburger H., Cerutti, D.T. & Sabel, B.A. (2000). Assessing spatial vision-automated measurement of the contrast-sensitivity function in the hooded rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 97, 103-110.
- Kelly, D. H. (1960). J0 stimulus patterns for vision research. *Journal of the Optical Society of America*, 50, 1115-1116.
- Kolb, B. (2005). In: Whishaw, I. Q., Kolb, B. The laboratory rat: a handbook with tests, *Neurological models*, 449-461.
- Lai, M. & Lewis, P. D. (1980). Effects of undernutrition on myelination in rat corpus callosum. *The Journal of Comparative Neurology*, 193, 973-982.
- Lai, M., Lewis, P. D. & Patel, A. J. (1980). Effects of undernutrition on gliogenesis and glial maturation in rat corpus callosum. *The Journal of Comparative Neurology*, 193, 965-972.
- Lauretti-Filho, A. & Romão, E. (1982). Estudo da acuidade visual e dos erros de refração em crianças com baixo rendimento escolar. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, 41, 31-36

- Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J. & Schilling, K. (2005). Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular. *Neuroscience Research*, 79(3), 295-302.
- Lister, J. P., Blatt, G. J., DeBassio, W. A., Kemper, T. L., Tonkiss, J., Galler, J. R. & Rosene, D. L. (2005). Effect of Prenatal Protein Malnutrition on Numbers of Neurons in the Principal Cell Layers of the Adult Rat Hippocampal Formation. *Hippocampus*, 15, 393-403.
- Liu, J., Raine, A., Venables, P. H. & Mednick, S. A. (2004). Malnutrition at age 3 years and externalizing behavior problems at ages 8, 11 and 17 years. *The American Journal of Psychiatry*, 161, 2005-2013.
- Lukoyanov, N. V. & Andrade, J. P. (2000). Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behavioural Brain Research*, 112, 85- 97.
- Maaswinkel, H., Jarrad, L. E. & Whishaw, I. Q. (1999). Hippocampectomized rats are impaired in homing by path integration. *Hippocampus*, 9, 553-561.
- Mahon, L.E. & DeValois, R.L. (2001). Cartesian and non-Cartesian responses in LGN, V1, and V2 cells. *Visual Neuroscience*, 18, 973-981.
- Merigan, W.H. (1996). Basic visual capabilities and shape discrimination after lesions of extrastriate area V4 in macaques. *Visual Neuroscience*, 13, 51-60.
- Milam, A. H., Dacey, D. M. & Dizhoor, A. M. (1984). Recovering immunoreactivity in mammalian cone bipolar cells. *Visual Neuroscience*, 10, 1-12.
- Miziara, I. D., Magalhães, A. T. M., Santos, M. A., Gomes, E. F., Oliveira, R. A. (2012). Research ethics in Animal Model. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 78(2), 128-31.

- Morale, S.E., Hoffman, D.R., Castañeda, Y.S., Wheaton, D.H., Burns, R.A. & Birch, E.E. (2005). Duration of long-chain polyunsaturated fatty acids availability in the diet and visual acuity. *Early Human Development*, 81, 197-203.
- Morgan, B. L., Naismith, D. J. (1982). The effect of early postnatal undernutrition on the growth and development of the rat brain. *Br J Nutr*, 48, 15–23.
- Morgane, P. J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, T., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E. & Resnick, O. (1978). The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system of the rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2, 137-230.
- Morgane, P. J., Austin-LaFrance, R. J., Bronzino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. & Galler, J. R. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 17, 91-128.
- Morgane, P. J., Mokler, D. J. & Galler, J. R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26, 471-483.
- Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12, 239-260.
- Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P. & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, 681-683.
- Noback, C. R. & Eisenman, L. M. (1981). Some effects of protein-calorie undernutrition on the developing central nervous system of the rat. *The Anatomical Records*, 201, 67-73.
- Norcia, A. M., Tyler, C. W. & Hamer, R. D. (1990). Development of contrast sensitivity in the human infant. *Visual Research*, 30, 1475–1486.

- O'Connor, A. R., Stephenson, T. J., Johnson, A., Tobin, M. J., Ratib, S., Moseley, M. et al. (2004). Visual Function in low birthweight children. *British Journal of Ophthalmology*, 88, 1149-1153.
- O'Keefe, J. B. & Nadel, R. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Oxford University Press.
- Olsen, J., Sorensen, H. T., Steffensen, F. H., Sabroe, S., Gillman, M. W., Fischer, P. et al. (2001). The Association of Indicators of Fetal Growth with Visual Acuity and Hearing among Conscripts. *Epidemiology*, 12, 235-23.
- Olton, D. S., Walker, J. A. & Gage, F. H. (1978). Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Research*, 139, 295-308.
- Olton, D. S. (1983). Memory functions and the hippocampus. In: Seifert W, editor. *Neurobiology of the hippocampus*, 335-374.
- Paula-Barbosa, M. M., Andrade, J. P., Azevedo, F. P., Madeira, M. D. & Alves, M. C. (1988). Lengthy administration of low-protein diet to adult rats induces cell loss in the hippocampal formation but not in the medial prefrontal cortex. *Society for Neuroscience Abstract*, 14, 368.
- Paula-Barbosa, M. M., Andrade, J. P., Castedo, J. L., Azevedo, F. P., Camões, I., Volk, B. & Tavares, M. A. (1989). Cell loss in the cerebellum and hippocampal formation of adult rats after long-term low protein diet. *Experimental Neurology*, 103(2), 186-93.
- Peeling, A. N. & Smart, J. L. (1994a). Review of literature showing that undernutrition affects the growth rate of all processes in the brain to the same extent. *Metabolic Brain Disease*, 9, 33-42.
- Peeling, A. N. & Smart, J. L. (1994b). Successful prediction of immediate effects of undernutrition throughout the brain growth spurt on capillarity and synapse-to-neuron ratio of cerebral cortex in rats. *Metabolic Brain Disease* 9, 81-95.

- Powls, A., Botting, N., Cooke, R. W. I., Stephenson, G. & Marlow, N. (1997). Visual impairment in very low birthweight children. *Archives of Disease in Childhood Fetal & Neonatal Edition*, 76 (2), 82-87.
- Prusky, G. T., West, P. W. R. & Douglas, R. M. (2000). Behavioral assessment of visual acuity in rats and mice. *Vision Research*, 40, 2201-2209.
- Prusky, G. T., Harker, K. T., Douglas, R. M., Ian, Q. & Whishaw, I. Q. (2002). Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behavioural Brain Research*, 136, 339-348.
- Prusky, G. T. & Douglas, R. M. (2003). Developmental plasticity of mouse visual acuity. *European Journal of Neuroscience*, 17, 167-173.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., & Fahey Jr, G.C. (1993). AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *The Journal of Nutrition*, 123, 1939-1951.
- Rocinholi, L.F., Almeida, S.S., & De Oliveira, L.M. (1997). Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 407- 413.
- Rodier, P. M. (1976). Critical periods for behavioral anomalies in mice. *Environmental Health Perspectives*, 18, 79-83.
- Rodier, P. M. (1980). Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 22, 525-545.
- Roorda, A. & Williams, D. R. (1998). Objective Identification of M and L Cones in the Living Human Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(4): 957.

- Rozovski, J., Noroa, F., Arbarzua, J. & Monckeberg, F. (1971). Cranial transillumination in early and severe malnutrition. *Brazilian Journal of Nutrition*, 25, 107-111.
- Sams-Dodd, F., Lipska, B. K. & Weinberger, D. R. (1997). Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology*, 132, 303-310.
- Smythe, J. W., Bhatnagar, S., Murphy, D., Timothy, C. & Costall, B. (1998). The effects of intrahippocampal scopolamine infusions on anxiety in rats as measured by the black-white box test. *Brain Research Bulletin*, 45, 89-93.
- SanGiovanni, J. P., Allred, E. N., Mayer, D. L., Stewart, J. E., Herrera, M. G. & Leviton, A. (2000). Reduced visual resolution acuity and cerebral white matter damage in very- low-birthweight infants. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 42, 809-815.
- Santos, N. A., Alencar, C. C. G. & Dias, Y. H. N. (2009). Contrast Sensitivity Function of Sine-Wave Gratings in Children with Acute Malnutrition. *Psychology & Neuroscience*, 2, 99-103.
- Santos, N. A. & Alencar, C. C. G. (2010). Early malnutrition diffusely affects children contrast sensitivity to sine-wave gratings of different spatial frequencies. *Nutritional Neuroscience*, 13, 189-194.
- Santucci, L. B., Daud, M. M., Almeida, S. S. & De Oliveira, L. M. (1994). Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49, 393- 398.
- Scalabrin, D.M., Mitmesser, S.H., Birch, E.E., Khoury, J.C., Bean, J., Harris, C.L. & Berseth, C.L. (2011). Lower incidence and less recurrence of allergic manifestations is

- observed in children who received DHA/ARA in infancy via breast milk or supplemented formula. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*.
- Schmucker, C., Seeliger, M., Humphries, P., Biel, M., & Schaeffel, F. (2005). Grating Acuity at Different Luminances in Wild-Type Mice and in Mice Lacking Rod or Cone Function. *Investigative Ophthalmology and Vision Science*, 46, 398-407.
- Sklar, E., Iny, K. J., Heynen, A. J., Bear, M. F. (2001). Behavioral assessment of acuity and contrast thresholds in normally reared and long-term monocularly deprived adult rats. *Society for Neuroscience Abstracts*, 27, 475-477.
- Sigulem, D. M., Devincenzi, M. U., & Lessa, A. C. (2000). Diagnóstico do Estado Nutricional da Criança e do Adolescente. *Jornal de Pediatria*, 76 (3), 275-284.
- Simonson, M. & Chow, B. F. (1970). Maze studies on progeny of underfed mother rats. *Journal of Nutrition*, 100, 685-690.
- Smart, J. L. (1990). Vulnerability of developing brain to undernutrition. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 48, 21-41.
- Smart, J. L. (1991). Critical periods in brain development. *CIBA Foundation Symposium*, 156, 109-124.
- Sterio, D. C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy*, 134, 127- 36.
- Strupp, B. J. & Levitsky, D. A. (1995). Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. *Journal of Nutrition*, 125, 2221-232.
- Suter, P. S., Suter, S., Roessler, J. S. *et al.* (1994). Spatial-frequency-tuned channels in early infancy: VEP evidence. *Visual Research*, 34, 737-745.
- Tejada, P. H. & Tedó, C.M. (1998). Contrast Sensitivity Function of the Albino Rat Determined Electrophysiologically. *The Spanish Journal of Psychology*, 11-17.

- Teodósio, N. R., Lago, E.S., Romani, S. A. M., Guedes, R. C. A. (1990). A regional basic diet from northeast of Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr*, 4, 533–547.
- Thylefors, B., Ruiz, L., Cardoso, M. D. P. S., Romero, L. C. & Barros, O. M. (1984). Proposta de um plano nacional de saúde ocular, com ênfase na atenção primária. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, 47, 2-6.
- Tornqvist, K. & Källén, B. (2004). Risk factors in term children for visual impairment without a known prenatal or postnatal cause. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 18, 425-430.
- Tonkiss, J., Galler, J. R. (1990). Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 40, 95-107.
- Tonkiss, J., Galler, J. R., Morgane, P. J., Bronzino, J. D. & Austin- LaFrance, R. J. (1993). Prenatal protein malnutrition and postnatal brain function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 678, 215-227.
- Tonkiss, J., Shultz, P. & Galler, J. R. (1994). An analysis of spatial navigation in prenatally protein malnourished rats. *Physiology & Behavior*, 55, 217-224.
- Uauy, R.D., Birch, D.G., Birch, E.E., Tyson, J.E. & Hoffman, D.R. (1990). Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinal function of very low birthweight neonates. *Pediatric Research*, 28, 485-92.
- Uauy, R.D., Birch, D., Birch, E., Tyson, J. & Hoffman, D. (1992). Are omega-3 fatty acids required for normal eye and brain development of the very low birthweight infant? *Recent Advances in Infant Feeding*, 13-21.
- Uauy, R., Birch, D., Birch, E., Hoffman, D. & Tyson, J. (1993). Effect of dietary essential omega-3 fatty acids on retinal and brain development in preterm infants. *Essential Fatty Acids and Eicosanoids*, 197-202.

- Uauy, R., Hoffman, D.R., Birch, E.E., Birch, D.G., Jameson, D.M. & Tyson, J. (1994). Safety and efficacy of omega-3 fatty acids in the nutrition of very low birth weight infants: Soy oil and marine oil supplementation of formula. *Journal of Pediatrics*, 124, 612-20.
- Uauy, R., Hoffman, D., Mena, P., Llanos, A. & Birch, E. (2003). Term infant studies of DHA and ARA supplementation on neurodevelopment: results of randomized controlled trials. *Journal of Pediatrics*, 143, 17-25.
- Umino, Y., Solessio, E. & Barlow, R. B. (2008). Speed, Spatial, and Temporal Tuning of Rod and Cone Vision in Mouse. *The Journal of Neuroscience*, 28 (1), 189-198.
- United Nations Children's Fund (UNICEF). (2007a). *The State of The World's Children 2008*. New York: Oxford University Press.
- United Nations Children's Fund (UNICEF). (2007b). *Progress for Children: A World Fit for Children statistical review*. New York: Oxford University Press.
- van Sluyters, R. C., Atkinson, M. S., Held, R. M. *et al.*, (1990). The development of vision and visual perception. Em: Spillmann SW, Werner JS. (Organizadores) *The Neurophysiological Foundations*. New York: Academic Press, 349–379.
- Vleugels, L., van Nunen, A., Lafosse, C., Ketelaer, P. & Vandenbussche, E. (1998). Temporal and spatial resolution in foveal vision of multiple sclerosis patients. *Vision Research*, 38, 2987-2997.
- Warren, M. A. & Bedi, K. S. (1982). Synapse-to-neuron ratios in the visual cortex of adult rats undernourished from about birth until 100 days of age. *The Journal of Comparative Neurology*, 210, 59-64.
- Warren, M. A. & Bedi, K. S. (1984). A quantitative assessment of the development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 227, 104-108.

- Wetherill, G. B., & Levitt, H. (1965). Sequential estimation of points on a psychometric function. *The British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, 48, 1-10.
- Whishaw, I. Q. (1998). Place learning in hippocampal rats and the path integration hypothesis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22, 209-220.
- Wilkinson, F., James, T. W., Wilson, H. R., Gati, J. S., Menon, E. S. & Goodale, M. A. (2000). An fMRI study of the selective activation of human extrastriate form vision areas by radial and concentric gratings. *Current Biology*, 10, 1455-1458.
- Williams, D. R. (1985). Aliasing in the human foveal vision. *Vision Research*, 25, 195-205.
- Wilson, H. R. (1988). Development of spatiotemporal mechanisms in infant vision. *Vision Research*, 28, 611-628.
- Winick, M. (1975). Effects of malnutrition on the maturing central nervous system. *Advances In Neurology*, 13, 193-246.
- Wolf, C., Almli, C. R., Finger, S. E., Ryan, S. & Morgane, P. J. (1986). Behavioral effects of severe and moderate malnutrition. *Physiology & Behavior*, 38, 725-730.
- World Health Organization -WHO. (2002). *Better health for poor children*. New York: Oxford University Press.
- World Health Organization -WHO. (2005). Challenges – World Health Report. Recuperado em 24 de fevereiro de 2008: <http://www.who.int/nutrition/challenges/en/print.html>.
- Xavier, G. F., Oliveira-Filho, F. J. B. & Santos, A. M. G. (1999). Dentate gyrus selective colchicine and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in place strategy because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus*, 9, 668-681.

Zamenhof, S. (1991). Depletion of individuals with “outstanding high” cerebral development in rats subjected to prenatal undernutrition. *Nutritional Research*, 11, 687–690.

ANEXO I

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 09 de dezembro de 2011.

PARECER 1034/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas com Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 07.12.2011, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Efeitos da Desnutrição Proteica na Percepção de Contraste e Acuidade Visual em Humanos e em Ratos!*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. **LUIZ ROBERTO GIORGETTI DE BRITTO**, Prof. Dr. **SEBASTIÃO DE SOUZA ALMEIDA**, Prof. Dr. **NATANAEL ANTÔNIO DOS SANTOS** e a aluna **CAROLINE COSTA GOMES ALENCAR**.

Cabe a pesquisadora executante elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **07.12.2012**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA NA PERCEPÇÃO DE CONTRASTE E ACUIDADE VISUAL EM HUMANOS E EM RATOS

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao(a) seu (sua) filho(a).

Eu , RG , abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a) nascido (a) em ____ / ____ / ____ , seja voluntário do estudo “**EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA NA PERCEPÇÃO DE CONTRASTE E ACUIDADE VISUAL EM HUMANOS E EM RATOS**”. Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que:

- I) O estudo é necessário para que se possam descobrir as possíveis consequências da condição denominada “**desnutrição protéica**”;
- II) Serão feitos testes para medir a visão do seu filho (a). Nesses testes visuais, ele (a) observará duas imagens na tela de um computador e em seguida escolherá uma delas. A criança tem que apertar um dos botões do mouse para indicar qual das duas imagens foi a escolhida. Cada teste dura em média de 5 a 10 minutos, e é preciso em média 4 sessões em dias diferentes;
- III) A participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho (a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médico a que ele (ela) estiver sendo submetido;
- VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados;

VII) Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;

VIII) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP - no Fone 3091.7733 (e-mail: *cep@icb.usp.br*) ou (nome e telefones de contato e e-mail do pesquisador responsável) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.

IX) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo a mim ou ao meu (minha) filho (a).

() Sim ou () Não

X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as _____ folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XII) Resolução 196/96 – Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

OBS: Assinalar abaixo com (x):

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 200..

() Paciente / () Responsável

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

(CAROLINE COSTA GOMES ALENCAR, DOUTORANDA EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO PELO INSTITUTO DE PSICOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

ANEXO III

ANAMNESE NUTRICIONAL

1. Caracterização familiar

1.1. Materna:

Nome: _____
Idade: _____ altura (cm) _____ peso (pré-gravidez, Kg): _____ peso (final da gravidez): _____ Ganho de peso na gravidez (kg): _____
Desnutrição materna? _____
Nº de filhos: _____ Gestação múltipla? _____
Problemas de saúde no período gestacional: (hipertensão, doença renal, diabetes, etc) _____
Teve alguma dessas infecções (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes viral etc)? _____
Fez uso de álcool, cigarro e/ou drogas não-permitidas durante a gravidez? _____ Qual (is)? _____. E durante a amamentação? _____
Fez pré-natal? _____ Nº de consultas? _____

1.2. Paterna:

Nome: _____
Idade: _____ Altura: _____ Peso: _____

2. Nutrição Materna

2.1. Durante o período gestacional:

- Quantas refeições você faz por dia? _____
- Geralmente, o que costumava comer e beber no café da manhã? _____
- No almoço? _____
- No jantar? _____
- Qual a sua Comida preferida ()? _____
- Tem algum alimento que você não gosta? _____
- Tem algum alimento que você não pode comer (intolerância alimentar)? _____
- Tomou suplemento vitamínico? _____
- Tomou suplemento de ferro? _____

2.2. Durante a amamentação:

- Geralmente, o que costumava comer e beber no café da manhã? _____
- No almoço? _____
- No jantar? _____
- Qual a sua Comida preferida? _____
- Tomou suplemento vitamínico? _____
- Tomou suplemento de ferro? _____

3. Nutrição do bebê

3.1. Peso ao nascimento: _____

3.2. Comprimento ao nascimento: _____

3.6. Nasceu prematuro? _____ Com quantos meses? _____
3.7. () Leite Materno. Qual o Intervalo entre as mamadas (horas)? _____
3.8. () Leite de Fórmula. Qual? _____ Quantidade (ml)? _____
3.9. Leite Materno e Fórmulas? _____ Quantidade (ml)? _____
_____ e a frequência? _____
3.10. Comida sólida? _____ Qual? _____
_____ Frequência? _____

4. Nutrição da Criança:

4.1. Problemas de saúde apresentados nos primeiros anos de vida? _____ 4.2. Problemas de saúde apresentados atualmente? _____
4.3.. Quantas refeições faz por dia? _____
- Geralmente, o que costuma comer e beber no café da manhã? _____
- No almoço? _____
- No jantar? _____
4.4. Qual comida preferida dela? _____
4.5. Tem algum alimento que ela não gosta? _____
4.6. Tem algum alimento que ela não pode comer (intolerância alimentar)? _____
4.7. Tomou/a suplemento vitamínico? _____
4.8. Tomou/a suplemento de ferro? _____
4.9. Mamou até quantos anos? _____
4.10. Com quantos anos acrescentou outros alimentos, que não o leite materno, na alimentação? _____
4.11. A alimentação é balanceada (tipos de alimentos)? _____

5. Dados gerais da Criança:

5.1. Nome: _____
5.2. Data de Nascimento? _____ Idade? _____
5.3. Altura? _____ Peso? _____
5.4. Faz que série? _____ Já repetiu de ano()/ Quantas Vezes? _____
5.6. Como é o rendimento escolar? _____
5.7. Faz algum esporte?() Qual? _____
5.8. Costuma dormir de que horas? _____ Quantas horas? _____
5.9. Assiste TV?() quantas horas por dia? _____
5.10. Apresenta visão normal ou corrigida? _____
5.11. Aprendeu a andar com quantos anos? _____ e a falar? _____
5.12. Aprendeu a ler() Com quantos anos? _____ e escrever?() _____

ANEXO IV

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS

Instituto de Psicologia
USP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto registrado sob o número 005.2010, para uso de animais em experimentação, intitulado **“Efeitos da desnutrição protéica na percepção de contraste e acuidade visual em humanos e em ratos.”**, submetido pelo Prof. Luiz Roberto G. de Britto e Caroline Costa Gomes Alencar foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animal (CEPA) do Instituto de Psicologia, em reunião de 28 de março de 2011.

We hereby certify that the Project **“Protein malnutrition effects on contrast and visual acuity in humans and rats”**, number 005.2010, submitted by Prof. Luiz Roberto G. de Britto and Caroline Costa Gomes Alencar, was approved by the Committee on Ethical Research on Animals (CEPA) of the Psychology Institute from Universidade de São Paulo.

São Paulo, 28 de março de 2011.

Profa. Dra. Maria Helena Leite Hunziker
Presidente da CEPA

Arlete A. Mendes de Almeida
Secretária da CEPA

ANEXO V

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0903122-7 A2**

* B R P I 0 9 0 3 1 2 2 A 2 *

(22) Data de Depósito: 11/08/2009
(43) Data da Publicação: 19/04/2011
(RPI 2102)

(51) *Int.Cl.:*
A61B 3/028

(54) Título: **APARELHO PARA AFERIR A CAPACIDADE VISUAL DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO EM CONDIÇÕES DIVERSAS**

(73) Titular(es): Universidade Federal da Paraíba

(72) Inventor(es): Caroline Costa Gomes Alencar, Natanael Antonio dos Santos

(57) Resumo: APARELHO PARA AFERIR A CAPACIDADE VISUAL DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO EM CONDIÇÕES DIVERSAS. Construído preferencialmente em material que garanta sua resistência e durabilidade em tamanhos e capacidades diversas para atender diferentes necessidades dos pesquisadores e usuários, com sua face superior aberta, dividido em duas seções contínuas, consistindo a primeira seção em formato preferivelmente trapezoidal delimitando em seu interior uma caixa de partida(1) contendo uma abertura de acesso(3) para permitir o acesso do espécime em teste a uma segunda seção formada por um compartimento(6) definindo um espaço maior separado por uma divisória(7) em forma de "V" contendo nas extremidades posteriores da passagem direita(8) e da passagem esquerda(9) os cartões com um estímulo visual(10) ou com um estímulo neutro(11) e o reforçador(13) que consiste em um bebedouro ou dispersador de alimento(13) encoberto pelos anteparos(14) e (14') que serão descobertos para permitir seu uso pelo espécime em teste quando este responder corretamente aos cartões de estímulo visual.