UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

*“Efeitos de diferentes técnicas de desnutrição protéica precoce sobre os processos de aprendizagem e memória espacial em ratos (*Rattus norvegicus*)”.*

Lucas Duarte Manhas Ferreira do Vales

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

Ribeirão Preto - SP

2012

LUCAS DUARTE MANHAS FERREIRA DO VALES

“Efeitos de diferentes técnicas de desnutrição protéica precoce sobre os processos de aprendizagem e memória espacial em ratos (*Rattus norvegicus*)”.

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida.

Ribeirão Preto - SP

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Vales, Lucas Duarte Manhas Ferreira do

Efeitos de diferentes técnicas de desnutrição protéica precoce sobre os processos de aprendizagem e memória espacial em ratos (*Rattus norvegicus*). Ribeirão Preto, 2012.

88 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Almeida, Sebastião de Sousa.

1. Desnutrição. 2. Aprendizagem. 3. Memória. 4. Modelos aquáticos de aprendizagem.

VALES, Lucas Duarte Manhas Ferreira do

Efeitos de diferentes técnicas de desnutrição protéica precoce sobre os processos de aprendizagem e memória espacial em ratos (*Rattus norvegicus*)

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida.

Aprovação em:

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

**A minha família e, em especial, a minha mãe, aos meus irmãos e a
minha noiva, pelo apoio, incentivo e amor incondicionais!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, energia sublime que me inspira, acalma e fortalece!

Agradeço a minha família, especialmente aos meus irmãos, a minha “outra-mãe”, a minha tia Eliane, à minha noiva e aos nossos pais e avós, pelo incentivo, pelas orientações, por cada momento compartilhado e por todo o suporte valioso e indispensável!

A minha mãe, pelo exemplo de dedicação, honestidade, ética, perseverança e fé! Muito obrigado por sua dedicação e carinho, pelo incentivo, pelas orientações e pelo amor incondicional que sempre foi meu baluarte!

A minha noiva, Renata, por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho, pelo cuidado, pela disposição e pelo companheirismo que têm nos possibilitado tantas conquistas! Obrigado pela compreensão, pelo amor e por cada sonho que juntos compartilhamos!

Aos meus amados irmãos, por serem meus melhores amigos, sempre! Passar por essa experiência incrível ao lado de vocês faz a jornada valer a pena.

Ao querido amigo Roberto Duarte, irmão de tantas vivências! Obrigado por tantos bons momentos compartilhados, pela serenidade, pela sabedoria, pelo bom humor de sempre e por ser presente!

Aos queridos amigos Lígia, Lívia, Lílían, Érica, Larissa, Marcel e Geraldo, por todos os bons momentos!

Agradeço aos colegas e amigos do Laboratório de Nutrição e Comportamento, aprendi muito no convívio com vocês. Gisele, Fernanda e Paula Carolina, obrigado, sobretudo, pela amizade!

Agradeço a todos os professores com os quais sempre pude aprender algo significativo, sobretudo a Prof^{ra}. Dr^a. Marisa Tomoe Hebihara Fukuda, por sua valiosa contribuição desde o início do curso de Mestrado; ao Prof. Dr. José Lino Oliveira Bueno, ao Prof. Dr. Gelson Genaro e a Prof^{ra}. Dr^a. Andréia Schmidt, pelas contribuições e sugestões no exame de Qualificação; a Prof^{ra} Dr^a Patrícia Ferreira Monticelli Almada, pela oportunidade de realização do estágio PAE e por todo o aprendizado proporcionado nesta experiência.

Agradeço aos técnicos João Luis Segala Borin, do Laboratório de Processos Associativos, Controle Temporal e Memória, e Rodrigo Focosi Mazzei, do Laboratório de Nutrição e Comportamento, pela contribuição prática e pelo apoio técnico.

Agradeço à secretária do Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, Renata Beatriz Vicentini Del Moro.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa: CAPES, CNPq e FAPESP.

Por fim, agradeço ao Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida, por ter me dado a oportunidade de chegar até aqui! Muito obrigado pela orientação dos meus estudos e por sua inestimável contribuição em minha formação acadêmica e profissional, por seu exemplo de incansável dedicação, profissionalismo e comprometimento!

RESUMO

VALES, L.D.M.F. **Efeitos de diferentes técnicas de desnutrição protéica precoce sobre os processos de aprendizagem e memória espacial em ratos (*Rattus norvegicus*)**. 2012. 88 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Inúmeros estudos têm demonstrado que a desnutrição protéica e/ou protéico-calórica, quando introduzida durante os estágios iniciais de desenvolvimento, produz diversas alterações neuroquímicas, neurofisiológicas e/ou funcionais no sistema nervoso central, além de comprometimentos físicos e atrasos no desenvolvimento cognitivo. O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos de quatro técnicas de desnutrição precoce sobre os processos de aprendizagem e memória espacial (operacional e de referência) em ratos adultos testados em duas tarefas de aprendizagem em dois modelos de labirintos aquáticos. Os animais foram agrupados em seis diferentes condições de acordo com o tratamento durante a fase de lactação: grupo controle (C1), ninhadas alimentadas com dieta normoproteica *ad libitum*; grupo desnutrido protéico (DP), ninhadas alimentadas com dieta hipoprotéica *ad libitum*; grupo desnutrido protéico-calórico (DPC), ninhadas alimentadas com dieta normoproteica, restrita a 50% da quantidade consumida por uma ninhada controle de mesma idade; grupo desnutrido de grandes ninhadas (DGN) ninhadas com um número de filhotes duas vezes maior que as demais, alimentadas com dieta normoproteica *ad libitum*; grupo desnutrido por separação temporária (DS) ninhadas separadas das mães por 12 horas diárias, alimentadas com dieta normoproteica *ad libitum*; grupo controle para a condição DS (C2), ninhadas alimentadas com dieta normoproteica *ad libitum*. As ninhadas dos grupos C, CS, DP, DPC e DS foram compostas por oito filhotes cada. As ninhadas CS foram separadas de suas mães e mantidas com outra rata fêmea adulta, não lactante, por 12 horas diárias. Após o desmame, todos os grupos foram alimentados com ração comercial para roedores. Todos os grupos desnutridos apresentaram prejuízos de aprendizagem e/ou memória na tarefa do labirinto aquático de Morris. Na tarefa do labirinto radial aquático, apenas ratos DP apresentaram diferenças de desempenho comparados aos ratos C, entretanto essas diferenças apareceram apenas em duas sessões iniciais e não foram persistentes. Os efeitos deletérios da desnutrição precoce sobre os processos de aprendizagem e memória, avaliados na idade adulta, foram sutis e específicos para cada técnica de desnutrição utilizada, em contraste aos acentuados déficits observados no desenvolvimento físico dos filhotes. Nossos resultados indicam que a desnutrição precoce foi capaz de ocasionar déficits de memória operacional e de referência na tarefa de aprendizagem espacial do labirinto de Morris, dependente,

preponderantemente, de estratégias de mapeamento espacial para sua resolução, entretanto não foram observados os mesmos efeitos na tarefa espacial do labirinto radial aquático solucionável também por estratégias de guiamento e orientação egocêntricas.

Palavras- Chave: Desnutrição, aprendizagem, memória, modelos aquáticos de aprendizagem.

ABSTRACT

VALES, L.D.M.F. **Effects of diferente early protein malnutrition techniques on learning and spatial memory processes in rats (*Rattus norvegicus*)**. 2012. 88 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Numerous studies have shown that protein and/or protein-calorie malnutrition, when introduced during the early stages of development, produces several neurochemical, neurophysiological and / or functional changes in central nervous system, in addition to physical impairments and delays in cognitive development. The effects of different early malnutrition techniques on learning and spatial memory processes in adult rats were evaluated in two water maze tasks. Animals were grouped into six different conditions according to treatment during lactation phase: control group (C1), litters fed a normal protein diet *ad libitum*; protein malnourished group (PM), litters fed a low protein diet *ad libitum*; protein-calorie malnourished group (PCM), litters fed with 50% of the amount of diet ingested by C; malnutrition-induced by an increase in the number of pups in the litters (LLM - twice the number of pups in C litters) fed a normal protein diet *ad libitum*; malnutrition induced by removal the pups from their dams half the day (RM), litters fed a normal protein diet *ad libitum*; control group for RM condition (C2), litters fed a normal protein diet *ad libitum*. C, CR, PM, PCM and RM litters were composed by eight pups each. RM litters were removed from their dams and kept 12 hours daily with a non-lactating female rat. After weaning, all groups were fed a lab chow. All malnourished groups showed learning and memory impairments in the Morris maze task. Nevertheless, only PM rats showed different performance in Radial-arm water maze. Compared to controls, PM rats had fewer working memory errors and spent less time to complete the second and fourth sessions, however no enduring differences between C and PM were observed along the sessions. Malnutrition insults on learning and memory in adulthood were tenuous and specific for each malnutrition technique, despite the pronounced physical damages. Our results suggest that early malnutrition leads to working and reference memory impairments in place-strategies dependent spatial task in the Morris maze but not in a spatial learning task in the Radial-arm water maze solvable by guidance and egocentric strategies either.

Keywords: Malnutrition, learning, memory, water maze tasks.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Latência de Fuga (Média $\pm$ EPM) nas 24 tentativas da fase de aprendizagem do LAM. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN(n=10) comparado com C (n=12). *p<0,05 comparado ao C2; # p<0,05 comparado ao C, ambos de acordo com o teste de Newman-Keuls.	38
Figura 2 – Distância Navegada (Média $\pm$ EPM) nas 24 tentativas da fase de aprendizagem do LAM. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN(n=10) comparado com C (n=12). *p<0,05 comparado ao C2; # p<0,05 comparado ao C, ambos de acordo com o teste de Newman-Keuls.	38
Figura 3 – Velocidade de Natação (Média $\pm$ EPM) nas 24 tentativas da fase de aprendizagem do LAM. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN (n=10) comparado com C (n=12).	39
Figura 4 – Movimento de Rotação (Média $\pm$ EPM) nas 24 tentativas da fase de aprendizagem do LAM. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN(n=10) comparado com C (n=12). *p<0,05 comparado ao C2, de acordo com o teste de Newman-Keuls.	39
Figura 5 – Ângulo de Deslocamento Inicial (Média $\pm$ EPM) nas 24 tentativas da fase de aprendizagem do LAM. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN(n=10) comparado com C (n=12).	40
Figura 6 – Latência de Fuga (A), Distância Navegada (B) e Movimento de Rotação (C) (Média $\pm$ EPM) no teste de retenção de memória do LAM do grupo DPC (n=12) comparado ao C (n=12); *p<0,05 comparado ao C; # p<0,05 comparado a última tentativa da fase de aprendizagem (24 ^a), ambos de acordo com o teste de Newman-Keuls.	41
Figura 7 - Erro de Memória de Referência (Média $\pm$ EPM) no teste do LRA. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN (n=10) comparado com C (n=12).	43
Figura 8 - Erro Operacional para Braço Incorreto (Média $\pm$ EPM) no teste do LRA. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN (n=10) comparado com C (n=12). *p<0,05 comparado ao C, de acordo com o teste de Newman-Keuls.	43
Figura 9 - Erro Operacional para Braço Correto (Média $\pm$ EPM) no teste do LRA. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN (n=10) comparado com C (n=12).	44

Figura 10 - Tempo Total por Sessão (Média $\pm$ EPM) no teste do LRA. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN (n=10) comparado com C (n=12). *p<0,05 comparado ao C, de acordo com o teste de Newman-Keuls.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Procedimento experimental adotado durante o período de lactação e tratamento nutricional no período de pós-lactação (recuperação nutricional).	29
Tabela 2 - Médias dos pesos corporais de todos os grupos experimentais.	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	23
3. MATERIAL E MÉTODO	25
3.1. Sujeitos	26
3.2. Composição das Ninhadas	26
3.3. Alojamento e Manutenção dos Animais	26
3.4. Composição das Dietas	27
3.5. Delineamento Experimental	27
3.6. Equipamentos	29
3.6.1. Labirinto Aquático de Morris - LAM	29
3.6.2. Labirinto Radial Aquático – LRA	30
3.7. Procedimentos	30
3.7.1. Labirinto Aquático de Morris	30
3.7.2. Labirinto Radial Aquático	31
3.8. Método de Eutanásia	32
3.9. Análise dos Dados	32
4. RESULTADOS	34
4.1. Peso Corporal	35
4.2. Dados Comportamentais	36
4.2.1. Labirinto Aquático de Morris	36
4.2.2. Labirinto Radial Aquático	41
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	54

APÊNDICE	61
APÊNCIDE A – Artigo apresentado no exame de Qualificação de Doutorado ...	62
ANEXOS	87
ANEXO A – Protocolo de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	88

1. INTRODUÇÃO

A nutrição tem implicação direta nos processos de formação, crescimento e organização funcional do organismo, sobretudo durante os estágios iniciais de desenvolvimento (GALLER; SHUMSKY; MORGANE; 1995). A nutrição representa um fator ambiental bastante significativo para a formação e maturação do sistema nervoso central (SNC) e, conseqüentemente, para a cognição e o desenvolvimento de comportamentos adaptativos.

Uma dieta insuficiente ou inadequada durante os primeiros estágios de desenvolvimento (períodos de gestação e lactação) constitui um insulto ambiental grave, relacionado a distúrbios comportamentais na vida adulta, decorrentes de alterações cerebrais morfológicas e funcionais (GEORGIEF, 2007, LEVITSKY, STRUPP, 1995, MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

Muitos estudos, conduzidos tanto em humanos quanto em animais, têm demonstrado que quaisquer alterações ambientais capazes de promover déficits nutricionais severos e/ou duradouros, durante os períodos críticos de desenvolvimento do SNC, podem produzir déficits cognitivos relevantes e persistentes, conseqüentemente, alterações comportamentais observadas em diversas etapas do desenvolvimento (para uma revisão ver LAUS et al., 2011).

Dados da Organização Mundial de Saúde (WHO – Nutrition health topics, 2006) mostram que, em pleno século XXI, a desnutrição (falta ou deficiência na ingestão de macro ou micronutrientes essenciais) ainda é responsável, direta ou indiretamente, por 54% das 10,8 milhões de mortes anuais de crianças com menos de cinco anos de idade. Mais de 70% das crianças que sofrem de desnutrição proteico-calórica vivem na Ásia, 26% delas vivem na África e 4% na América Latina (WHO, 2006). A desnutrição crônica atinge cerca de 792 milhões de pessoas em todo o mundo, abrangendo 20% da população dos países em desenvolvimento. Mundialmente, a desnutrição atinge uma em cada três pessoas e em suas formas mais severas torna-se significativamente mais nociva do que diversas outras enfermidades (WHO, 2006).

Esses dados demonstram que a desnutrição representa um grave problema mundial de saúde. Contudo, em países em desenvolvimento, esse problema é ainda mais preocupante por estar associado a vários outros fatores como pobreza, falta de acesso à educação, ineficiência ou ausência de serviços de saúde, saneamento básico, segurança, entre outros, geralmente interdependentes e capazes de agravar seus sintomas, aumentar o risco de doenças crônicas e reduzir drasticamente a qualidade e a expectativa de vida.

Entretanto, quando se estuda os efeitos deletérios da desnutrição sobre o organismo é necessário considerar o tipo de desnutrição (protéica, proteico-calórica, de vitaminas ou outros nutrientes), sua intensidade, duração e período da vida em que ocorre, bem como sua incidência concomitante a outros fatores, como aqueles relacionados a características do ambiente que também seriam capazes de influenciar no desenvolvimento físico e cognitivo.

A duração e o período de introdução do insulto nutricional determinam o impacto que ela terá sobre o sistema nervoso central (SNC) e o comportamento. Outro aspecto que deve ser considerado ao se avaliar os efeitos da desnutrição protéica ou proteico-calórica sobre o organismo é a maneira de inserir o insulto nutricional no início da vida; esse procedimento define a técnica de desnutrição utilizada.

Quanto mais precoce e severa for a desnutrição, mais prejudiciais e duradouros serão seus efeitos sobre o desenvolvimento e maturação do SNC e, por conseguinte, sobre a cognição e o repertório comportamental do animal (MORGANE et al., 1978).

A utilização de técnicas de desnutrição em experimentação animal, principalmente em roedores, torna possível isolar e/ou manipular algumas variáveis que, no homem, são de difícil identificação e controle, porque envolvem fatores relacionados à estimulação ambiental, questões sociais, nível econômico, cultural, rotina, entre outros que, de maneira complexa, influenciam-se mutuamente. Não obstante, a utilização de modelos experimentais animais justifica-se por princípios éticos.

Todavia, a utilização de modelos de experimentação animal não representa um paradigma simples. A desnutrição protéica ou proteico-calórica imposta no período de lactação interfere na interação mãe-filhote e pode produzir efeitos adversos sobre a quantidade e qualidade dos comportamentos maternos voltados à prole, devido ao insulto nutricional a que essas mães são submetidas (CRNIC, 1980; SMART; PREECE, 1973; RIUL et al., 1999). Do mesmo modo, uma redução na quantidade de proteínas ingerida pela ratamãe pode afetar a qualidade e a quantidade do leite disponível aos filhotes e causar uma diminuição dos aminoácidos necessários ao crescimento e desenvolvimento dos mesmos (CAMBRAIA; VANNUCCHI; DE OLIVEIRA, 1997; CRNIC; CHASE, 1978; PASSOS; RAMOS; MOURA, 2000; PINE; JESSOP; OLDHAM, 1994).

Existem várias técnicas de desnutrição experimental em roedores e todas que são introduzidas no período de lactação produzem alterações no desenvolvimento e crescimento dos filhotes porque reduzem o suprimento de leite materno e alteram sua qualidade (CRNIC; CHASE, 1978; PASSOS; RAMOS; MOURA, 2000; PINE; JESSOP; OLDHAM, 1994).

No presente estudo, serão utilizadas quatro técnicas de desnutrição, descritas a seguir:

Desnutrição Protéica

Nesta técnica de desnutrição, o déficit nutricional é provocado por uma redução na quantidade de proteínas da dieta oferecida à rata-mãe. A carência nutricional decorrente da redução desse nutriente resulta em uma diminuição da quantidade e qualidade do leite produzido, levando à desnutrição dos filhotes.

Ratas-mães desnutridas apresentam um comportamento de reconstrução do ninho diminuído e são um pouco mais lentas no teste de recolhimento dos filhotes, porém elas passam mais tempo no ninho, cuidando da prole (MASSARO; LEVITSKY; BARNES, 1974).

Desnutrição Proteico-Calórica

Esta técnica de desnutrição corresponde a uma redução na quantidade de dieta ingerida pela rata-mãe. Esta redução se reflete diretamente na quantidade de leite produzido pelas glândulas mamárias destas ratas. Nestas condições, as ratas recebem alimento apenas uma vez por dia e ele é consumido em poucas horas. A utilização desta técnica, assim como a técnica de desnutrição protéica, provoca desnutrição tanto nas ratas-mães quanto em seus filhotes.

Ratas-mães desnutridas ficam mais tempo no ninho, exceto nos momentos do dia em que são alimentadas (CRNIC, 1980). Elas também demoram mais para recolher os filhotes no teste de recolhimento (SMART; PREECE, 1973). O maior tempo gasto pelas ratas-mães submetidas à desnutrição protéica ou proteico-calórica neste teste de recolhimento pode ser resultado da carência nutricional.

Desnutrição de Grandes Ninhadas

Nesta técnica, a desnutrição é causada pelo aumento do número de filhotes na ninhada. Em grandes ninhadas, o acesso à fonte de alimento é dificultado. A relação entre a grande quantidade de filhotes e o número de mamilos maternos aumenta significativamente a competição entre os filhotes.

Esta técnica dificulta uma avaliação precisa entre os efeitos da desnutrição e a influência de outras variáveis psicossociais, devido à competição entre os filhotes pela fonte de alimento e pelo cuidado materno. A competição pelos mamilos maternos pode produzir uma variabilidade indesejada no estado nutricional de filhotes de uma mesma ninhada, porque frequentemente alguns filhotes são mais bem sucedidos que outros (FRANKOVÁ, 1972).

Mães que cuidam de grandes ninhadas diminuem o tempo total gasto com a ninhada em função do número de filhotes (GROTA; ADER, 1969). A utilização desta técnica produz alterações no comportamento materno e nas atividades e posições dos filhotes, quando

comparados a ninhadas de tamanho padrão. Em grandes ninhadas, os filhotes passam mais tempo em movimento (competindo, se agregando) e menos tempo em contato passivo com a mãe (FRANKOVÁ, 1972).

Desnutrição por Separação Temporária

Na técnica de separação temporária, os filhotes são retirados da mãe por um período do dia, reduzindo a oportunidade ou o tempo de amamentação. Esta separação altera o ambiente social, termal e sensorial dos filhotes. Para a manutenção da temperatura corporal, os filhotes podem permanecer em incubadoras ou com “ratas-tias”. Estas ratas podem ser fêmeas lactantes que sofreram remoção cirúrgica dos mamilos ou ratas virgens sensibilizadas – treinadas para cuidar dos filhotes, mas sem a capacidade de alimentá-los.

A carência nutricional dos filhotes resulta em uma atenção aumentada das mães. Fêmeas lactantes e não lactantes que cuidam de ninhadas desnutridas permanecem por mais tempo com os filhotes e constroem ninhos de melhor qualidade, em relação às fêmeas que cuidam de ninhadas bem nutridas (FLEISCHER; TURKEWITZ, 1981).

A utilização de diferentes técnicas de desnutrição exige atenção cuidadosa quanto às diferenças encontradas em uma mesma técnica. Estas diferenças ocorrem por variações na espécie estudada, quantidade e proporção de machos e fêmeas que compõem as ninhadas, época de desmame, duração dos períodos de desnutrição e recuperação nutricional, percentual de restrição de um determinado nutriente ou quantidade total de dieta oferecida, além de alterações nas condições de alojamento e idade dos animais no período de testes.

De maneira geral, todos os nutrientes essenciais, presentes em uma dieta balanceada, influenciam a maturação cerebral, porém a proteína parece ser o nutriente mais importante para o desenvolvimento estrutural e funcional do sistema nervoso. Os aminoácidos que formam as proteínas são precursores de hormônios, enzimas, neurotransmissores peptídicos ou constituem-se neurotransmissores. Além disso, eles são precursores de todas as proteínas estruturais, essenciais para o crescimento dos tecidos corporais, incluindo o cérebro. Pela extensa participação dos aminoácidos na organização do SNC, fica evidente que o envolvimento dessas moléculas não se restringe apenas à função de síntese protéica.

O SNC é fortemente vulnerável à desnutrição protéica ou proteico-calórica durante todo o período de seu desenvolvimento (GALLER; SHUMSKY; MORGANE, 1995; LEVITSKY; STRUPP, 1995; MORGANE et al., 1978; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). A desnutrição proteica precoce severa produz alterações neuroquímicas, neurofisiológicas e funcionais no SNC e consequentes distorções em padrões de

desenvolvimento de algumas estruturas cerebrais cujo desenvolvimento se prolonga após o nascimento, como o hipocampo, o bulbo olfatório e o cerebelo (ALMEIDA; TONKISS; GALLER, 1996; MORGANE et al., 1993), além disso, outras consequências evidenciadas correspondem ao estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio na proporção de radicais livres no córtex cerebral e no cerebelo e à diminuição nos níveis de resíduos de aminoácidos no córtex, no hipocampo e no cerebelo (FEOLI et al., 2006). Alguns exemplos dessas alterações são: (1) menor tamanho cerebral; (2) menor número de células; (3) alterações na ramificação dendrítica e na camada de mielina dos neurônios e (4) alterações na atividade de sistemas enzimáticos, interferindo na síntese protéica e na estrutura das proteínas (GALLER; SHUMSKY; MORGANE; 1995; MORGANE et al., 1993; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

Sabe-se que o período crítico de desenvolvimento cerebral no rato ocorre nas três primeiras semanas após o nascimento, com especial ênfase para os processos de crescimento cerebral, mielinização, microneurogenese (células granulares do giro denteado – DG, bulbo olfatório e cerebelo) e gliogenese tardia (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). A nutrição representa a principal influência ambiental sobre o desenvolvimento fetal e neonatal; por esse motivo, uma dieta balanceada, com aporte adequado de nutrientes essenciais, é fundamental para a manutenção do crescimento e do desenvolvimento normal de todas as funções fisiológicas (MORGANE et al., 1978; MORGANE et al., 1993; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

De acordo com vários estudos realizados nas últimas décadas, as alterações comportamentais mais significativas relatadas em ratos desnutridos nos períodos pré-natal e pós-natal (iniciando-se no nascimento) referem-se à reatividade emocional e à sensibilidade aumentada a estímulos ambientais aversivos (ALMEIDA et al., 1992; ALMEIDA; DE OLIVEIRA, 1994; LEVITSKY; BARNES, 1970; ROCINHOLI; ALMEIDA; DE OLIVEIRA, 1997; SMART; WATSON; DOBBING, 1975), maior impulsividade associada a menor ansiedade (ALMEIDA; DE OLIVEIRA; GRAEFF, 1991; ALMEIDA et al., 1994; HERNANDES et al., 2005; SANTUCCI et al., 1994), flexibilidade cognitiva reduzida (STRUPP; LEVITSKY, 1995), dificuldades de aprendizagem e déficits de memória (BARNES et al., 1966; FUKUDA; FRANÇOLIN-SILVA; ALMEIDA, 2002; FUKUDA et al., 2007; VALADARES; ALMEIDA, 2005; VALADARES et al., 2010; ZHANG; LI; YANG, 2010).

Uma estrutura do encéfalo particularmente afetada pela desnutrição precoce é o hipocampo. Alterações nessa estrutura têm sido amplamente estudadas, pois ela estaria

diretamente envolvida com processos de aprendizagem e memória (COSTA; BUENO; XAVIER, 2005; IZQUIERDO; MEDINA, 1997; LUKOYANOV; ANDRADE, 2000; OLTON; PAPAS, 1979; MORGANE et al., 1993; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002; MORRIS et al., 1982; NADEL; MACDONALD, 1980; RIEDEL; MICHEAU, 2001; VAN DER STAAY et al., 1990; XAVIER; OLIVEIRA-FILHO; SANTOS, 1999; XAVIER; COSTA, 2009). A neurogênese desta estrutura tem seu desenvolvimento no período pré-natal, estendendo-se ao período pós-natal, tanto em ratos como em humanos, com um de seus picos de crescimento e desenvolvimento durante este segundo período (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). A maior parte das alterações cognitivas observadas por déficits de aprendizagem e memória em ratos desnutridos no início da vida são relacionadas a alterações funcionais no hipocampo e neocórtex decorrentes da desnutrição severa precoce (para uma revisão ver MORGANE et al., 1978 e MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Essas premissas são corroboradas por trabalhos que demonstraram dificuldades de aprendizagem e prejuízos na memória em tarefas de aprendizagem e memória espaciais (XAVIER; OLIVEIRA-FILHO; SANTOS, 1999; XAVIER; COSTA, 2009; COSTA; BUENO; XAVIER, 2005) e não espaciais (PRUSKY et al., 2004) após lesões hipocampais.

Alterações no funcionamento hipocampal, como déficits no contato sináptico e em sistemas de neurotransmissores (colinérgico, dopaminérgico, gabaérgico, glutamatérgico, serotoninérgico) que se constituem bases neuroquímicas para os processos de memória (MYHRER, 2003), podem produzir déficits de aprendizagem e memória espacial (BEDI, 1991; CINTRA et al., 1990; FUKUDA et al., 2007; IZQUIERDO; MEDINA, 1997; LUKOYANOV; ANDRADE, 2000; MORGANE et al., 1993).

De acordo com a teoria de *Mapa Cognitivo* ou *Mapa Alocêntrico* proposta por O'Keefe e Nadel em 1978, o hipocampo constitui-se em uma estrutura do SNC envolvida nos processos de aprendizagem e no armazenamento da representação espacial do ambiente em mapas cognitivos. Segundo estes autores, o conceito de mapa cognitivo refere-se ao estabelecimento de relações entre pistas associadas a um local determinado e suas posições relativas; este processo resulta na construção de representações espaciais do ambiente (mapas cognitivos) e capacita o animal a utilizar tais representações para orientar-se num determinado contexto espacial (O'KEEFE; NADEL, 1978¹ apud WISHAW; MITTLEMAN, 1986). Através da inspeção, manipulação ou movimentos de locomoção do animal no ambiente (comportamentos que constituem a exploração), as informações são adquiridas, processadas e

¹ O'KEEFE, J. B.; NADEL, R. **The Hippocampus as a cognitive map**. Oxford, England. Clarendon, 1978.

resultam em algum tipo de representação cognitiva do ambiente. Este processo resulta na aprendizagem espacial. Em suma, um objeto, uma pista ou um lugar é novo ou estranho para o animal se ele não estiver representado em um mapa cognitivo.

Aprendizagem e memória são processos imprescindíveis para a sobrevivência do organismo em determinadas condições ambientais. A memória tem como função básica o armazenamento de informações. Informações outrora armazenadas passam por um processo de contínua categorização, para que, num momento oportuno, possam ser recuperadas e reutilizadas.

Segundo Squire (1987), os conceitos de aprendizagem e memória estão relacionados; a aprendizagem representa o processo de aquisição de novas informações e a memória se refere à persistência da aprendizagem em um estado que pode ser revelado em um momento posterior. Deste modo, a memória é a consequência da aprendizagem.

Grande parte das concepções sobre aprendizagem e memória surgiu no contexto da experimentação animal em labirintos (MORRIS, 1981; MORRIS, et al., 1982; OLTON, 1979; OLTON; PAPAS, 1979; SCHENK; MORRIS, 1985). O estudo da aprendizagem requer a compreensão das propriedades comportamentais que envolvem esse processo. A análise de desempenho, ou seja, das modificações observáveis no comportamento do sujeito que aprende, possibilita a formulação de hipóteses que orientam o trabalho. Para tanto, deve-se considerar as condições que antecedem o desempenho, o desempenho em si mesmo e as consequências do desempenho.

Diversos modelos têm sido utilizados no estudo da aprendizagem e memória espacial em animais desnutridos, tais como o labirinto radial (JORDAN; CANE; HOWELLS, 1981; HALL, 1983), o labirinto em T – tarefa de discriminação (TONKISS; GALLER, 1990; JAISWAL et al., 1999), alternância espacial (WOLF et al., 1986; CASTRO; TRACY; HUDY, 1989) e o labirinto aquático de Morris (CAMPBELL; BEDI, 1989; BEDI, 1992; TONKISS; SHULTZ; GALLER, 1994; LUKOYANOV; ANDRADE, 2000; FUKUDA; FRANÇOLIN-SILVA; ALMEIDA, 2002; FUKUDA et al., 2007). Dentre os modelos citados, o labirinto aquático de Morris (*Morris Water Maze* – MWM) tem sido o mais utilizado (D’HOOGE; DE DEYN, 2001). O modelo foi descrito por Morris em 1981 e consiste em um tanque circular preenchido com água e uma pequena plataforma de fuga. Morris desenvolveu este modelo para investigar orientação e memória espacial em ratos (D’HOOGE; DE DEYN, 2001). Os animais buscam a plataforma como fuga a um estímulo aversivo e esse comportamento é natural tanto em animais desnutridos quanto em bem nutridos.

A preferência por esse modelo para o estudo envolvendo animais desnutridos justifica-se pela vantagem de não necessitar qualquer tipo de recompensa alimentar. Esse tipo de recompensa, além de servir como pista visual e/ou olfativa, poderia motivar mais intensamente o comportamento de animais desnutridos (BARNES et al., 1968; SMART; DOBBING, 1977). Da mesma forma, o labirinto radial aquático (*Radial-arm Water Maze* – RAWM) constitui-se um instrumento adequado no estudo de animais desnutridos, pois oferece as mesmas vantagens.

O labirinto radial aquático foi derivado do labirinto radial terrestre, desenvolvido por Olton e Samuelson (1976). A técnica do labirinto radial vem sendo utilizada como instrumento padrão na investigação da memória espacial operacional em ratos (OLTON; BECKER; HANDELMANN, 1979; OLTON, 1983). A versão original consiste num labirinto radial de oito braços, igualmente espaçados de uma área circular central. Animais privados de alimento eram colocados no labirinto e, no início de cada tentativa diária, era depositado alimento na extremidade de cada um dos oito braços – ou apenas em alguns braços para testes de memória espacial de referência e operacional, avaliadas simultaneamente (OLTON; PAPAS, 1979). A estratégia ótima era entrar em cada braço (reforçado positivamente pela apresentação do estímulo apetitivo) apenas uma vez, obtendo a quantidade máxima de alimento no menor espaço de tempo e com mínimo esforço. Os animais precisavam recordar quais braços já haviam sido visitados durante a tentativa e evitar reentradas naqueles que não seriam mais reforçados – e naqueles nunca reforçados (testes de memória espacial de referência e operacional).

Com a finalidade de eliminar os problemas associados à privação de alimento e às pistas olfativas, Buresová et al. (1985) desenvolveram um modelo aquático do labirinto radial. Contudo, o modelo exigia um complicado sistema de automatização. Baseados nesse modelo, Hyde, Sherman e Denenberg (1996) desenvolveram um labirinto radial aquático simplificado (não automatizado), no qual camundongos eram capazes de aprender facilmente. Este modelo não automatizado possibilitava o estudo simultâneo da memória operacional e de referência. A ideia principal deste labirinto diz respeito a tarefas de fuga da água por reforçamento negativo. Nesta versão do labirinto radial, quatro braços são sempre reforçados (plataformas submersas permitem a fuga do estímulo aversivo) enquanto que os outros quatro nunca o são.

Tendo em vista que somente quatro dos oito braços são reforçados (plataforma de fuga), os tipos de erros possíveis devem ser analisados de maneira separada. Operacionalmente, os erros são classificados em três tipos: Erros de memória de referência (EMR): a primeira entrada em um braço que nunca apresentou plataforma de fuga

anteriormente; Erros de memória operacional para braços corretos (EMOC): reentradas em braços onde anteriormente, numa mesma sessão, haviam sido encontradas plataformas de fuga; Erros de memória operacional para braços incorretos (EMOI): reentradas em braços nunca reforçados por plataformas de fuga, numa mesma tentativa.

A memória de trabalho ou operacional e a memória de referência podem ser definidas, respectivamente, como: a) codificação de informações apresentadas em contextos temporais específicos, mantidas por períodos de tempo durante os quais sejam relevantes, distinguindo um instante dentro de um conjunto de eventos, susceptível às interferências de efeitos temporais e b) codificação das informações que são utilizadas em diferentes situações e que são menos vulneráveis ao contexto específico sob o qual foram adquiridas, portanto, menos propensa à interferência temporal (HONIG, 1978² apud OLTON; PAPAS, 1979).

O modelo do labirinto radial aquático ainda é pouco utilizado e não existem dados na literatura a respeito de animais desnutridos testados neste modelo.

Tanto o labirinto aquático de Morris quanto o labirinto radial aquático representam sólidas ferramentas no estudo da memória operacional e memória de referência e, conseqüentemente, no estudo e observação dos comportamentos intrínsecos ao processo de aprendizagem.

Apesar de terem sido extensivamente descritas e discutidas alterações em padrões comportamentais decorrentes de desnutrição protéica precoce, em diversos estudos experimentais em animais, a maior parte em ratos, nos últimos cinquenta anos (para uma revisão mais aprofundada ver LEVITSKY; STRUPP, 1995; MORGANE et al., 1978; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002; LAUS et al., 2011), existem poucos estudos que investigaram a desnutrição protéica pós-natal e seus efeitos sobre os processos cognitivos. Ademais, muitas controvérsias ainda circundam o estudo da aprendizagem e da memória em animais desnutridos.

² HONING, W. K. Studies of working memory in the pigeon. In: HULS, S. H.; FOWLER, H.; HONING, W. K., editors. **Cognitive processes in animal behavior**. Hillsdale: Erlbaum, 1978, p. 211-248.

2. OBJETIVO

Analisar os efeitos de diferentes técnicas de desnutrição protéica precoce sobre a aprendizagem e memória espacial (operacional e de referência) de ratos submetidos a dois modelos experimentais aquáticos de aprendizagem e memória. Além disso, foi medido e analisado o ganho de peso semanal dos animais de todas as condições nutricionais, como indicativo do desenvolvimento físico.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Sujeitos

No presente trabalho, foram utilizados 68 ratos albinos, machos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 08.1.1279.53.9) (Anexo A).

3.2. Composição das Ninhadas

Os animais foram recebidos no dia do nascimento e transportados até o Biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento, departamento de Psicologia, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCLRP. Cada ninhada foi composta pela rata-mãe, seis filhotes machos e duas fêmeas. Os filhotes foram separados por sexo e designados em grupos aleatoriamente, a fim de se evitar que, na formação das ninhadas, fossem agrupados somente filhotes provenientes de uma mesma rata-mãe. Do nascimento aos 21 dias de idade (fase de lactação), os animais foram amamentados pelas ratas-mães. Neste período, cada ninhada foi designada aleatoriamente em grupo nutricional controle ou um dos quatro grupos experimentais (representados no Delineamento Experimental). Os pesos das ratas-mães e respectivas ninhadas foram registrados no dia 0 (dia de nascimento dos filhotes) e aos 7, 14 e 21 dias de vida dos filhotes. Durante todo o período anterior à gestação, as ratas-mães foram tratadas, no Biotério Central do Campus, com dieta comercial balanceada.

3.3. Alojamento e Manutenção dos Animais

Durante a fase de lactação (0 – 21 dias), as ninhadas foram alojadas em caixas de polietileno (41 cm x 34 cm x 16 cm), forradas com raspas de madeira (maravalha), com tampa gradeada de aço inoxidável, comedouro e bebedouro de vidro. A maravalha foi trocada semanalmente. A comida e a água foram trocadas diariamente. Aos 21 dias foi realizado o desmame – separação dos filhotes das ratas-mães (sacrificadas a partir desta data, assim como os filhotes fêmeas). Nos testes de aprendizagem e memória, foram utilizados apenas ratos machos, pois as fêmeas apresentam ciclo estral, uma variável que se decidiu excluir.

Durante a fase de pós-lactação os ratos foram alojados em caixas (do mesmo material e tamanho já citados) e divididos em grupos menores (dois animais por caixa). A maravalha foi trocada de duas a três vezes por semana. Neste período, entre o desmame e início dos testes, todos os animais receberam dieta comercial para laboratório, *ad libitum*. Essa fase correspondeu ao período de recuperação nutricional para os animais desnutridos.

Após o desmame, o peso dos animais foi registrado aos 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 e 98 dias de vida. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos com livre acesso à água. O biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento teve a temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$), e a iluminação artificial programada para ciclos de claro/escuro com duração de 12 horas cada um, com acendimento das luzes programado para as 6h00 da manhã.

3.4. Composição das Dietas

As dietas controle e hipoprotéica – utilizadas na alimentação dos animais durante a fase de lactação – foram preparadas de acordo com Barnes et al. (1968) com algumas modificações conforme descrito por Santucci et al. (1994), baseadas nas recomendações da dieta para roedores AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). As duas condições de dieta foram suplementadas com L-metionina (2,0g/kg de proteína), pois a caseína é deficiente nesse aminoácido. Não houve diferença quanto à porcentagem dos demais componentes (vitaminas e minerais). Na composição da dieta hipoprotéica, a porcentagem de carboidratos foi aumentada para a obtenção de dietas isocalóricas.

3.5. Delineamento Experimental

As ninhadas foram divididas para comporem seis grupos experimentais distintos, de acordo com as condições de tratamento, como descrito a seguir:

- **Grupo Desnutrido Proteico (DP)** – as ninhadas foram compostas por oito filhotes (seis machos e duas fêmeas) e a rata-mãe. As ratas-mães tiveram livre acesso à dieta hipoprotéica (6% de proteína) durante todo o período de lactação.

- **Grupo Desnutrido por Restrição Proteico-Calórica (DPC)** – as ninhadas foram compostas por oito filhotes (seis machos e duas fêmeas) e a rata-mãe. Durante todo o período de lactação, as ratas-mães receberam 50% da dieta balanceada (16% de proteína) ingerida pelas ratas-mães do grupo controle no mesmo período. Neste procedimento, a dieta colocada nos comedouros das ratas-mães do grupo controle foi pesada e trocada todos os dias, no

período da manhã, para mensuração do consumo diário. No primeiro dia de lactação das ratas-mães do grupo DPC foi fornecido 10g de dieta.

- **Grupo Desnutrido de Grandes Ninhadas (DGN)** – as ninhadas foram compostas por 16 filhotes (12 machos e quatro fêmeas) e a rata mãe. Durante todo o período de lactação, as ratas-mães receberam a mesma dieta (16% de proteína) consumida pelas ratas-mães do grupo controle. Nesta técnica de grandes ninhadas, a desnutrição ocorre por aumento no número de filhotes e consequente aumento da competição entre eles por acesso à fonte de alimento.

- **Grupo Desnutrido por Separação Temporária (DS)** – as ninhadas foram compostas por oito filhotes (seis machos e duas fêmeas) e a rata-mãe. No período de lactação, os filhotes permaneceram com as ratas-mães por 12 horas diárias (18h00 às 6h00). Durante as outras 12 horas (6h00 às 18h00), os filhotes foram mantidos sob os cuidados de “ratas-tias” (fêmeas virgens sensibilizadas). As ratas-mães e as “ratas-tias” tiveram livre acesso à dieta balanceada (16% de proteína) por todo o período de lactação.

As “ratas-tias” foram submetidas a um treinamento para que pudessem cuidar dos filhotes neste intervalo em que eles estavam separados das ratas-mães. O treinamento consistiu em exposições diárias dos filhotes a estas fêmeas não lactantes por um período crescente de tempo. As ratas que apresentaram comportamento de canibalismo, bem como aquelas que não apresentaram comportamentos de cuidado dos filhotes durante esse período foram sacrificadas. Este treinamento foi realizado por um período de 21 dias (semelhante ao período de lactação).

- **Grupo Controle (C)** – as ninhadas foram compostas por oito filhotes (seis machos e duas fêmeas) e a rata-mãe. As ratas-mães tiveram livre acesso à dieta balanceada (16% de proteína) durante todo o período de lactação. Este grupo foi utilizado como parâmetro para os grupos DP, DPC e DGN.

- **Grupo Controle 2 (CS)** – a composição das ninhadas e o tratamento nutricional foram os mesmos descritos no grupo C. Contudo, os filhotes do grupo CS foram manipulados diariamente, durante o período de lactação. A manipulação consistiu em trocar esses animais de caixa, juntamente com a rata-mãe, no início do dia, e devolvê-los à caixa em que estavam anteriormente, no fim do dia, nos mesmos horários em que foram manipulados os animais do grupo DS. Esse procedimento foi adotado para que CS pudesse servir de parâmetro para DS, uma vez que os filhotes deste grupo desnutrido foram manipulados diariamente no mesmo período.

O procedimento experimental está esquematizado na Tabela 1.

Tabela 1 - Procedimento experimental adotado durante o período de lactação e tratamento nutricional no período de pós-lactação (recuperação nutricional).

de pós lactação (recuperação nutricional).			
Grupo	Lactação (0 até 21 dias)		Pós-lactação – desmame até final dos testes (21 até 98 dias)
C	Dieta controle (16% de proteína), ad libitum	8 filhotes 24h com rata-mãe	Dieta comercial, ad libitum
CS		8 filhotes, manipulados diariamente 24h com rata-mãe	
DS		8 filhotes, manipulados diariamente 12h com rata-mãe/12h com ‘rata-tia’	
DGN		16 filhotes 24h com rata-mãe	
DPC	Dieta controle (16% de proteína), 50% da dieta ingerida pelo grupo C1	8 filhotes 24h com rata-mãe	
DP	Dieta hipoprotéica (6 % de proteína), ad libitum		

3.6. Equipamentos

3.6.1. Labirinto Aquático de Morris - LAM

Este labirinto aquático consiste em um tanque circular de fibra de vidro, pintado de preto, com 155 cm de diâmetro e 39 cm de altura, preenchido com água a uma temperatura controlada de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). A distância entre a superfície da água e a borda do tanque foi de 12,5 cm. O tanque foi dividido em quatro quadrantes imaginários (para efeito de registros comportamentais) numerados em sentido horário (Q1, Q2, Q3 e Q4). Uma plataforma circular de acrílico transparente de 12 cm de diâmetro e 25 cm de altura (submersa 1,5 cm abaixo do nível da água) foi colocada dentro do tanque numa posição fixa no centro de um dos quatro quadrantes imaginários (Q1).

O labirinto aquático foi colocado no centro de uma sala, sobre uma estrutura de 50 cm de altura construída em madeira maciça. Em áreas externas ao tanque foram oferecidas algumas pistas – tais como figuras nas paredes, que diferiam em tamanho (aproximadamente 70 X 40 cm) e forma, janelas e a porta da sala – que serviram como pistas visuais distais para orientar a navegação dos animais. Não foram oferecidas pistas visuais proximais, nem pistas olfativas ou auditivas.

Para registro e monitoramento das sessões experimentais foi utilizado o tracejador *EthoVision 3.1 Color Pro* – Noldus Information Technology – que possibilitou a análise do procedimento experimental por meio de dados precisos de navegação, como latência de fuga (tempo gasto para encontrar a plataforma), distância navegada, movimentos de rotação, ângulo de deslocamento inicial e velocidade de natação dos animais em cada tentativa.

3.6.2. Labirinto Radial Aquático - LRA

O labirinto radial aquático consistiu em um labirinto construído em aço galvanizado, com oito braços removíveis (12,7 x 29,7 x 43,7 cm) igualmente espaçados de uma área central de 49,1 cm de diâmetro e plataformas de fuga (7,5 x 11 x 1,5 cm), construídas em acrílico transparente, distribuídas aleatoriamente em quatro braços, do labirinto. A distância entre os braços do labirinto (medida na borda da área central) foi de 5,6 cm.

O labirinto radial foi colocado no centro de um tanque circular de fibra de vidro (mesmas medidas e especificações descritas no LAM), preenchido com água a uma temperatura controlada de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). As plataformas, submersas a 1,5 cm da superfície da água, foram encaixadas nas extremidades de quatro braços, escolhidos de acordo com os pontos cardeais norte (N), sul (S), leste (L) e oeste (O) e suas posições permaneceram fixas durante todo o experimento, para cada animal. A distância entre a superfície da água e a borda do labirinto foi de 9 cm.

O tanque foi colocado no centro de uma sala, sobre uma estrutura de 50 cm de altura. Em áreas externas ao tanque, tal como no labirinto aquático de Morris, foram oferecidas pistas visuais distais. Não foram oferecidas pistas visuais proximais, nem pistas olfativas ou auditivas.

As sessões experimentais foram monitoradas e gravadas através de uma vídeo-câmera (AS-3 Tracker, San Diego, USA), fixada no teto, acima do aparato e conectada a um computador (Intel Pentium Dual Core 2.16 GHz LG – BRA), instalado numa sala adjacente. Para aferição do tempo em cada tentativa foi utilizado um cronômetro digital (Casio HS - 80TW).

3.7. Procedimentos

3.7.1. Labirinto Aquático de Morris

Aos 70 dias de vida, todos os animais dos cinco grupos nutricionais foram testados na tarefa de aprendizagem e memória espacial, no labirinto aquático de Morris. O teste no labirinto aquático foi realizado em quatro dias consecutivos (seis tentativas diárias).

No primeiro dia de testes, antes da primeira tentativa, cada animal foi colocado na plataforma durante 60 segundos. Após esse intervalo de tempo o animal foi posicionado de costas para o centro do tanque, em um dos quadrantes (exceto aquele onde permaneceu a

plataforma) e foi permitido a ele nadar em busca da plataforma de fuga por um período de 60 segundos. Cada animal foi submetido a seis tentativas diárias, durante quatro dias consecutivos, totalizando 24 tentativas.

A plataforma permaneceu na mesma localização durante todo o experimento.

Nas ocasiões em que um animal não conseguiu alcançar a plataforma dentro do tempo estabelecido, ele foi guiado pelo experimentador até a plataforma. Entre as tentativas, cada animal permaneceu sobre a plataforma por um intervalo de 35 segundos. As posições de saída para cada tentativa foram determinadas aleatoriamente em proporções iguais.

Depois da última tentativa (24ª) do quarto dia de testes, a plataforma foi removida e o animal colocado no quadrante diagonalmente oposto àquele que continha a plataforma e foi imposto um período de 60 segundos de natação (*probe trial* – 25ª tentativa). Foi registrado o tempo despendido e analisado o percentual de permanência em cada quadrante e a frequência com que o animal cruzou a área delimitada anteriormente pela plataforma. A *probe trial* possibilita analisar a precisão de navegação do animal em busca da plataforma, bem como, a efetivação do aprendizado da tarefa.

Após quatro semanas desta fase de testes, cada animal foi novamente testado em uma única tentativa (teste de retenção de memória - 26ª tentativa). Os animais foram colocados no labirinto aquático, no quadrante diagonalmente oposto àquele em que estava fixada a plataforma. Nesta tentativa, cada animal teve 180 segundos para encontrar a plataforma submersa que está na mesma localização em que permaneceu durante todo o experimento. Essa 26ª tentativa foi aplicada para que se pudesse avaliar a consolidação da memória sobre o aprendizado adquirido durante a execução da tarefa, na primeira etapa de testes, no labirinto aquático.

Ao final da realização dos testes no labirinto de Morris, todos os animais permaneceram no biotério, sob as mesmas condições de tratamento e alojamento e sem qualquer outro tipo de manipulação, por um período de sete dias. Após esse período, todos os animais foram submetidos a um novo teste de aprendizagem e memória, no labirinto radial aquático.

3.7.2. Labirinto Radial Aquático

O procedimento de teste no labirinto radial aquático consistiu em uma sessão diária, durante doze dias consecutivos.

No primeiro dia de teste foi realizada uma sessão de treinamento. Nessa sessão, o animal foi colocado no braço de partida, de costas para a área central do labirinto, e foi liberado para encontrar uma das quatro plataformas de fuga. Ele teve 120 segundos para localizar uma plataforma. Quando o animal não conseguiu localizar uma plataforma dentro do intervalo de tempo estabelecido ele foi guiado à plataforma mais próxima. Quando encontrou ou foi guiado à plataforma, o animal permaneceu sobre ela por 10 segundos e, depois desse tempo, foi retirado da água. Ele ficou fora da água por um intervalo de 90 segundos. Durante esse intervalo de tempo a plataforma encontrada foi removida. Em seguida, o animal foi colocado no braço de partida e, novamente, liberado para encontrar outra plataforma. Essa sequência de eventos foi repetida até que o animal encontrasse as quatro plataformas. Desse modo, cada sessão experimental no labirinto radial aquático foi composta por quatro tentativas de 120 segundos cada (intercaladas por intervalos de 90 segundos).

Nos dias subsequentes, os animais foram colocados no labirinto radial e o mesmo procedimento adotado no treinamento foi repetido. O procedimento experimental completo tem 12 sessões consecutivas. Cada dia de teste consistiu na realização de uma sessão experimental.

Toda vez que o animal entrou em um braço que não apresentava uma plataforma, esse comportamento foi considerado um erro. Neste modelo animal de aprendizagem e memória, foram considerados três tipos de erros: (1) erros de memória operacional para braços corretos (EMOC); (2) erros de memória operacional para braços incorretos (EMOI) e (3) erros de memória de referência (EMR). O tempo despendido para realização da tarefa em cada sessão também foi medido e analisado.

3.8. Métodos de Eutanásia

Após todos os procedimentos experimentais os animais foram sacrificados por inalação de CO₂. Posteriormente, os animais foram enviados ao Biotério Central para incineração.

3.9. Análise dos Dados

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

(técnica x tentativa), com repetição no fator tentativa, com exceção da análise da frequência de cruzamentos no local da plataforma – na *probe trial* – realizada por meio do teste *t-Student* para amostras independentes ($p < 0,05$). Os dados relativos aos tipos de erros (EMOC, EMOI e EMR) e ao tempo total por sessão no labirinto radial aquático foram submetidos a uma ANOVA de dois fatores (técnica x dia), com repetição no fator dia. Quando apropriado, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Peso Corporal

Todas as ninhadas desnutridas apresentaram menores medidas de peso corporal quando comparadas às ninhadas controles durante todo o período de lactação. A única exceção ocorreu com o grupo DGN na terceira semana do período de lactação, desta semana até o fim dos experimentos, não houve diferença de pesos entre os grupos C e DGN.

De acordo com a ANOVA, utilizada para todas as análises de medida de peso corporal, as ninhadas DS tiveram menores pesos corporais conforme revelado por um efeito de dieta ($F_{(1,2)} = 129,3$; $p < 0,05$), dia ($F_{(3,6)} = 600,6$; $p < 0,05$) e interação dieta/dia ($F_{(3,6)} = 84,9$; $p < 0,05$). A análise *Post-hoc* revelou menores pesos das ninhadas DS, comparadas às ninhadas CS, nas primeiras três semanas de vida ($p < 0,05$). As ninhadas DGN também tiveram pesos menores como demonstrado por um efeito de dieta ($F_{(1,4)} = 41,4$; $p < 0,05$), dia ($F_{(3,12)} = 1581,6$; $p < 0,05$) e interação dieta/dia ($F_{(3,12)} = 12,4$; $p < 0,05$).

A análise de comparações múltiplas mostrou menor peso corporal dos filhotes DGN em comparação ao grupo C na primeira e segunda semanas de vida, segunda e terceira pesagens respectivamente ($p < 0,05$). As ninhadas do grupo DP também tiveram menor peso corporal como revelado por efeito de dieta ($F_{(1,5)} = 723,4$; $p < 0,05$), dia ($F_{(3,15)} = 804,7$; $p < 0,05$) e interação entre dieta/dia ($F_{(3,15)} = 343,6$; $p < 0,05$). Do mesmo modo, ninhadas do grupo DPC tiveram menor peso corporal nas pesagens semanais como demonstrado por efeito de dieta ($F_{(1,5)} = 189,7$; $p < 0,05$), dia ($F_{(3,15)} = 1280,6$; $p < 0,05$) e interação entre dieta/dia ($F_{(3,15)} = 96,0$; $p < 0,05$). A análise de comparações múltiplas mostrou menor peso corporal das ninhadas DP e DPC nas primeiras três semanas de vida ($p < 0,05$).

Durante o período de pós-lactação somente os ratos do grupo DGN apresentaram pesos corporais similares àqueles verificados nos ratos C. Ratos de todos os outros grupos desnutridos tiveram menores pesos corporais quando comparados aos bem nutridos em todas as pesagens até o final dos experimentos aos 98 dias de vida. A análise dos animais do grupo DS comparados ao grupo CS revelou efeito de dieta ($F_{(2,21)} = 61,5$; $p < 0,05$), dia ($F_{(7,147)} = 1405,0$; $p < 0,05$) e interação entre dieta/dia ($F_{(7,147)} = 5,1$; $p < 0,05$). Ratos DP também tiveram menor peso corporal como demonstrado por efeito de dieta ($F_{(1,27)} = 75,3$; $p < 0,05$), dia ($F_{(7,189)} = 1960,0$; $p < 0,05$) e interação entre dieta/dia ($F_{(7,189)} = 5,5$; $p < 0,05$). A análise de peso dos animais do grupo DPC revelou efeito de dieta ($F_{(1,22)} = 13,9$; $p < 0,05$), dia ($F_{(7,154)} = 1013,8$; $p < 0,05$) e interação entre dieta/dia ($F_{(7,154)} = 4,4$; $p < 0,05$). A análise de comparações múltiplas

dos animais dos grupos DS, DP e DPC mostrou menor peso corporal em comparação aos seus respectivos grupos controle em todos os dias de pesagem durante o período de pós-lactação e também no 70º e 98º dias de vida ($p<0,05$), respectivamente no início e no final dos testes comportamentais.

As médias de peso corporal dos animais dos seis grupos experimentais durante o período de lactação e pós-lactação estão delineadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Médias dos pesos corporais de todos os grupos experimentais.

Grupos Experimentais	Período de Lactação			Período de Pós-Lactação	
	1ª semana	2ª semana	3ª semana	70º dia	98º dia
C	201,3 ± 3,9	358,0 ± 4,9	591,8 ± 13,1	543,4 ± 21,4	647,1 ± 22,2
CS	200,5 ± 6,5	367,5 ± 14,5	654,5 ± 30,5	550,4 ± 12,8	636,7 ± 21,3
DP	132,0 ± 3,0 *	158,0 ± 9,5 *	181,3 ± 9,3 *	425,7 ± 6,6 *	527,0 ± 7,9 *
DPC	161,0 ± 5,5 *	249,0 ± 7,9 *	370,3 ± 11,8 *	474,8 ± 12,8 *	560,7 ± 13,9 *
DGN	118,88 ± 2,3 *	307,68 ± 2,6 *	568,72 ± 2,9	511,7 ± 20,5	635,3 ± 26,1
DS	112,5 ± 2,5 #	192,5 ± 11,5 #	331,0 ± 3,0 #	443,8 ± 11,9 #	542,6 ± 13,7 #

Peso corporal (Média ± EPM); * $p<0,05$ comparado ao grupo C; # $p<0,05$ comparado ao grupo CS.

4.2. Dados Comportamentais

4.2.1. Labirinto Aquático de Morris

Fase de Aquisição da Aprendizagem

Os dados do LAM revelaram diferentes efeitos para cada parâmetro avaliado entre os grupos desnutridos em comparação aos seus respectivos controles. Para avaliar as estratégias de navegação foram analisados cinco parâmetros comportamentais de navegação: Latência de Fuga, Distância Navegada, Velocidade de Natação, Movimento de Rotação e Ângulo de Deslocamento Inicial. Contudo, somente a latência de fuga, a distância navegada e o movimento de rotação mostraram resultados significativos a respeito do desempenho dos animais.

A análise da latência de fuga dos animais do grupo DS revelou efeito de tentativa ($F_{(23,460)} = 13,5$; $p<0,05$) e interação entre dieta/tentativa ($F_{(23,460)} = 4,1$; $p<0,05$). A análise de comparações múltiplas mostrou um aumento na latência de fuga dos animais do grupo DS quando comparados aos animais do grupo CS nas tentativas 7 e 8 ($p<0,05$), respectivamente na primeira e segunda tentativas do segundo dia de treino, Figura 1A. A análise da distância

navegada revelou efeito de tentativa ($F_{(23,460)} = 14,4$; $p < 0,05$) e interação entre dieta/tentativa ($F_{(23,460)} = 3,1$; $p < 0,05$). A análise de comparações múltiplas mostrou maiores valores de distância navegada nas tentativas 3, 7 e 8 dos animais do grupo DS ($p < 0,05$), Figura 2A. Quanto à análise de velocidade de natação, houve apenas efeito de tentativa ($F_{(23,460)} = 2,3$; $p < 0,05$), conforme ilustrado na Figura 3A. A análise do movimento de rotação revelou efeito de tentativa ($F_{(23,460)} = 8,0$; $p < 0,05$) e interação entre dieta/tentativa ($F_{(23,460)} = 2,4$; $p < 0,05$). A análise de comparações múltiplas mostrou maiores valores de movimento de rotação do grupo DS quando comparados ao grupo CS nas tentativas 7 e 8 ($p < 0,05$), Figura 4A. E a análise do ângulo de deslocamento inicial revelou efeito de tentativa somente ($F_{(23,460)} = 14,8$; $p < 0,05$), como demonstrado na Figura 5A.

A análise dos dados de latência de fuga (Figura 1B), distância navegada (Figura 2B), velocidade de natação (Figura 3B), movimento de rotação (Figura 4B) e ângulo de deslocamento inicial (Figura 5B) dos animais do grupo DPC, revelou somente efeito de tentativa ($F_{(23,506)} = 19,3$; $p < 0,05$), ($F_{(23,506)} = 20,6$; $p < 0,05$), ($F_{(23,506)} = 3,1$; $p < 0,05$), ($F_{(23,506)} = 17,9$; $p < 0,05$) e ($F_{(23,506)} = 24,9$; $p < 0,05$) respectivamente.

As análises dos dados de latência de fuga, dos animais do grupo DP revelaram efeito de dieta ($F_{(1,22)} = 4,4$; $p < 0,05$) com maiores latências do grupo DP comparados ao grupo C (Figura 1C) e efeito de tentativa ($F_{(23,506)} = 17,6$; $p < 0,05$). A análise da distância navegada (Figura 2C) revelou efeito de dieta ($F_{(1,22)} = 4,8$; $p < 0,05$) e tentativa ($F_{(23,506)} = 18,7$; $p < 0,05$). Quanto à análise de velocidade de natação, houve apenas efeito de tentativa ($F_{(23,506)} = 2,9$; $p < 0,05$), conforme ilustrado na Figura 3C. A análise do movimento de rotação revelou somente efeito de tentativa ($F_{(23,506)} = 17,5$; $p < 0,05$), Figure 4C. E a análise do ângulo de deslocamento inicial revelou efeito de tentativa somente ($F_{(23,506)} = 15,9$; $p > 0,05$), como demonstrado na Figura 5C.

Os dados de latência de fuga dos animais do grupo DGN (Figura 1D) revelaram efeito de tentativa ($F_{(23,460)} = 15,7$; $p < 0,05$) e interação entre dieta/tentativa ($F_{(23,460)} = 1,5$; $p < 0,05$) com maiores latências para o DGN. Do mesmo modo, os dados da distância navegada (Figura 2D) revelaram efeito de tentativa ($F_{(23,460)} = 14,9$; $p < 0,05$) e interação entre dieta/tentativa ($F_{(23,460)} = 1,6$; $p < 0,05$). A análise de comparações múltiplas não mostrou diferença significativa entre o grupo DGN e o C para a mesma tentativa da mesma sessão para a latência de fuga e distância navegada ($p < 0,05$), mas o grupo DGN apresentou maiores valores nos parâmetros avaliados. E, por fim, as análises dos dados de velocidade de natação (Figura 3D), movimento de rotação (Figura 4D) e ângulo de deslocamento inicial (Figura 5D) revelaram somente efeito de tentativa, ($F_{(23,460)} = 14,7$; $p < 0,05$).

Figura 1 – Latência de Fuga (Média $\pm$ EPM) nas 24 tentativas da fase de aprendizagem do LAM. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN(n=10) comparado com C (n=12). * $p < 0,05$ comparado ao CS; # $p < 0,05$ comparado ao C, ambos de acordo com o teste de Newman-Keuls.

Figura 2 – Distância Navegada (Média $\pm$ EPM) nas 24 tentativas da fase de aprendizagem do LAM. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN(n=10) comparado com C (n=12). * $p < 0,05$ comparado ao CS; # $p < 0,05$ comparado ao C, ambos de acordo com o teste de Newman-Keuls.

Figura 3 – Velocidade de Natação (Média $\pm$ EPM) nas 24 tentativas da fase de aprendizagem do LAM. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN (n=10) comparado com C (n=12).

Figura 4 – Movimento de Rotação (Média $\pm$ EPM) nas 24 tentativas da fase de aprendizagem do LAM. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN(n=10) comparado com C (n=12). * $p < 0,05$ comparado ao CS, de acordo com o teste de Newman-Keuls.

Figura 5 – Ângulo de Deslocamento Inicial (Média $\pm$ EPM) nas 24 tentativas da fase de aprendizagem do LAM. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN(n=10) comparado com C (n=12).

Teste Probe-trial

Não houve diferença entre os grupos desnutridos e controles quanto ao tempo de permanência no quadrante alvo (aquele em que foi posicionada a plataforma), tampouco quanto à frequência de cruzamentos na área correspondente ao local onde permaneceu a plataforma. Todos os grupos despenderam mais tempo na exploração do quadrante alvo, em detrimento dos outros três quadrantes – CS *vs* DS ($F_{(3,63)} = 27,49307$), C *vs* DP ($F_{(3,66)} = 92,51933$), C *vs* DPC ($F_{(3,66)} = 80,07327$) e C *vs* DGN ($F_{(3,63)} = 73,88607$); $p < 0,05$. Do mesmo modo, todos os grupos apresentaram frequências semelhantes de cruzamentos na área correspondente ao local da plataforma – CS *vs* DS ($t_{(21)} = -0,715409$), C *vs* DP ($t_{(22)} = 0,808520$), C *vs* DPC ($t_{(22)} = 0,248514$) e C *vs* DGN ($t_{(21)} = -0,058165$); $p < 0,05$.

Teste de Retenção de Memória

Somente o grupo DPC apresentou diferenças de desempenho quando comparado ao C no teste de retenção de memória aos 98 dias. Os dados de latência de fuga revelaram efeito de dieta ($F_{(1,22)} = 5,1$; $p < 0,05$) e tentativa ($F_{(1,22)} = 13,8$; $p < 0,05$), Figura 6A; Os dados da distância navegada também demonstraram efeito de dieta ($F_{(1,22)} = 6,3$; $p < 0,05$) e tentativa

($F_{(1,22)} = 18,2$; $p < 0,05$) Figura 6B; bem como a análise do movimento de rotação que mostrou efeito de dieta ($F_{(1,22)} = 5,6$; $p < 0,05$) e tentativa ($F_{(1,22)} = 17,7$; $p < 0,05$), (Figura 6C).

Figura 6 – Latência de Fuga (A), Distância Navegada (B) e Movimento de Rotação (C) (Média $\pm$ EPM) no teste de retenção de memória do LAM do grupo DPC (n=12) comparado ao C (n=12); * $p < 0,05$ comparado ao C; # $p < 0,05$ comparado a última tentativa da fase de aprendizagem (24ª), ambos de acordo com o teste de Newman-Keuls.

4.2.2. Labirinto Radial Aquático

Os dados comportamentais do LRA demonstraram diferenças somente para o grupo DP em comparação ao C. Os outros grupos desnutridos não apresentaram diferenças quando

comparados aos controles. Houve apenas efeito de tentativa, revelado pela análise de variância, mostrando uma melhora no desempenho de todos os grupos ao longo das sessões do teste. Isto significa que todos os animais de todos os grupos reduziram o número total de erros e o tempo total por sessão para completar a tarefa entre as sessões até o final do experimento.

A análise do grupo DS comparado ao CS revelou somente efeito de tentativa para erro de memória de referência (Figura 7A), erro operacional para braço incorreto (Figura 8A), erro operacional para braço correto (Figura 9A) e tempo total por sessão (Figura 10A), respectivamente ($F_{(11,220)} = 2,7; p < 0,05$), ($F_{(11,220)} = 6,0; p < 0,05$), ($F_{(11,220)} = 2,9; p < 0,05$) e ($F_{(11,220)} = 19,4; p < 0,05$).

A análise do grupo DPC mostrou somente efeito de tentativa para erro de memória de referência (Figura 7B), erro operacional para braço incorreto (Figura 8B), erro operacional para braço correto (Figura 9B) e tempo total por sessão (Figura 10B), ($F_{(11,242)} = 8,4; p < 0,05$), ($F_{(11,242)} = 24,3; p < 0,05$), ($F_{(11,242)} = 10,1; p < 0,05$) e ($F_{(11,242)} = 37,9; p < 0,05$), respectivamente.

Ratos do grupo DP apresentaram somente efeito de tentativa para erro de memória de referência (Figura 7C) e erro operacional para braço correto (Figura 9C), ($F_{(11,242)} = 6,0; p < 0,05$), ($F_{(11,242)} = 5,4; p < 0,05$), respectivamente. Contudo, a análise revelou efeito de tentativa para erro operacional para braço incorreto ($F_{(11,242)} = 12,5; p < 0,05$) e interação entre dieta/tentativa ($F_{(11,242)} = 2,0; p < 0,05$). Do mesmo modo, a análise do tempo total por sessão mostrou efeito de tentativa ($F_{(11,242)} = 20,7; p < 0,05$) e interação entre dieta/tentativa ($F_{(11,242)} = 3,6; p < 0,05$), respectivamente. A análise de comparações múltiplas indicou menores erros de memória de trabalho (EMOI) na segunda sessão e menor tempo total por sessão na segunda e quarta sessões para os animais do grupo DP em comparação aos animais do grupo C, Figuras 8C e 10C, respectivamente.

A análise dos dados do grupo DGN também apresentou efeito de tentativa para erro de memória de referência (Figura 7D), erro operacional para braço incorreto (Figura 8D), erro operacional para braço correto (Figura 9D) e tempo total por sessão (Figura 10D), ($F_{(11,220)} = 8,8; p < 0,05$), ($F_{(11,220)} = 16,8; p < 0,05$), ($F_{(11,220)} = 8,1; p < 0,05$) e ($F_{(11,220)} = 29,2; p < 0,05$), respectivamente.

Figura 7 – Erro de Memória de Referência (Média $\pm$ EPM) no teste do LRA. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN (n=10) comparado com C (n=12).

Figura 8 – Erro Operacional para Braço Incorreto (Média $\pm$ EPM) no teste do LRA. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN (n=10) comparado com C (n=12). * $p < 0,05$ comparado ao C, de acordo com o teste de Newman-Keuls.

Figura 9 – Erro Operacional para Braço Correto (Média $\pm$ EPM) no teste do LRA. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN (n=10) comparado com C (n=12).

Figura 10 – Tempo Total por Sessão (Média $\pm$ EPM) no teste do LRA. A: DS (n=12) comparado com CS (n=10); B: DPC (n=12) comparado com C (n=12); C: DP (n=12) comparado com C (n=12); D: DGN (n=10) comparado com C (n=12). * $p < 0,05$ comparado ao C, de acordo com o teste de Newman-Keuls.

5. DISCUSSÃO

Todas as técnicas de desnutrição utilizadas foram eficientes em provocar um menor ganho de peso dos filhotes desnutridos, como demonstrado através das medidas de peso corporal aferidas durante o período de lactação. As ninhadas desnutridas tiveram pesos corporais menores, comparadas às ninhadas controles, durante todo o período de lactação. Somente os filhotes DGN tiveram pesos semelhantes àqueles verificados nos filhotes C, na terceira semana de vida, na pesagem realizada no dia do desmame. Do mesmo modo, apenas o grupo DGN teve peso corporal semelhante ao grupo C após o desmame. Este resultado difere daquele encontrado em um estudo anterior de nosso grupo em que, durante todo o período de testes, ratos do grupo DGN tiveram pesos corporais menores que ratos controles (HERNANDES et al., 2005). O resultado apresentado no presente trabalho pode ser explicado por meio das observações feitas durante o tratamento desses animais, sobretudo no período de lactação, através das quais foi possível verificar que os mesmos eram capazes de alimentarem-se da dieta normoproteica, oferecida às ratas-mães, desde a segunda semana de vida, período em que esses filhotes já estavam aptos a explorar suas caixas livremente e, desse modo, compartilhar com as mães a dieta disponível, diminuindo a necessidade de competição por alimento entre eles.

A diferença entre os pesos corporais observada no período de lactação e permanente em todo o período de pós-lactação, exceto apenas para o grupo DGN, pode ser explicada pelo fato de que os pesos corporais de ratos adultos são determinados durante os períodos de gestação e lactação, dependentes, portanto, das condições nutricionais existentes nestes períodos (BARNES et al., 1968; PASSOS; RAMOS; MOURA, 2000). Estes efeitos são corroborados por resultados apresentados em trabalhos prévios que utilizaram desnutrição pós-natal (BARNES et al., 1968; HEMB; CAMMAROTA; NUNES, 2010; HERNANDES et al., 2005; PASSOS; RAMOS; MOURA, 2000; PINE; JESSOP; OLDHAM, 1994; VALADARES et al., 2010; ZHANG; LI; YANG, 2010).

Nossos resultados indicaram que a desnutrição precoce imposta resultou em déficits de memória operacional e de referência em ratos adultos testados no LAM, não obstante à técnica de desnutrição utilizada e após um período significativo de recuperação nutricional. Nosso grupo já havia demonstrado a ocorrência de prejuízos na aprendizagem e déficits de memória operacional e de referência, durante a fase de aquisição da aprendizagem e no teste de retenção de memória, em ratos desnutridos no período pós-natal e testados na tarefa do LAM, tanto para desnutrição imposta apenas durante o período de lactação (VALADARES;

ALMEIDA, 2005) quanto prolongada até os 49 dias de vida (FUKUDA; FRANÇOLIN-SILVA; ALMEIDA, 2002; FUKUDA et al., 2007; VALADARES et al., 2010). Além disso, muitos estudos anteriores apresentaram dados de alterações funcionais, neuroquímicas ou morfológicas na formação hipocampal, diretamente relacionadas a alterações comportamentais e prejuízos cognitivos, em consequência à desnutrição protéica precoce (BEDI, 1991; CINTRA et al., 1990; FUKUDA et al., 2007; GALLER; SHUMSKY; MORGANE, 1995; LUKOYANOV; ANDRADE, 2000; MORGANE et al., 1978; ZHANG; LI; YANG, 2010).

Todavia, nenhum estudo prévio havia investigado os processos de aprendizagem e memória espacial, operacional e de referência, simultaneamente, nesses dois modelos aquáticos distintos de aprendizagem, a fim de compreender os possíveis efeitos tardios ou permanentes da desnutrição precoce sobre as estratégias de navegação espacial de ratos adultos.

Com o intuito de investigar tanto a memória operacional quanto de referência na tarefa do LAM, utilizou-se a versão de memória de referência (pistas visuais distais) da tarefa, na qual a plataforma submersa e invisível permaneceu numa posição fixa no decorrer de todas as sessões de treino. Era esperado que os animais pudessem utilizar as informações adquiridas em uma sessão diária de treino nas sessões subsequentes para solucionar a tarefa e encontrar a plataforma escondida. Dessa maneira, a aprendizagem consistiu em, gradualmente, reduzir o tempo gasto, nadar menores distâncias e mover-se de maneira mais precisa em direção ao quadrante alvo, entre as tentativas, no decorrer das sessões (WISHAW; MITTLEMAN, 1986; XAVIER; OLIVEIRA-FILHO; SANTOS, 1999).

Durante toda a fase de treino (aquisição da aprendizagem), os animais foram liberados de quatro diferentes pontos de partida na borda do tanque; portanto, para um desempenho satisfatório, os ratos deveriam adquirir informações precisas das posições das pistas visuais externas e a posição da plataforma relativa a estas pistas, utilizando estratégias espaciais de navegação, de acordo com a teoria do mapa cognitivo (O'KEEFE; NADEL, 1978³ apud WISHAW; MITTLEMAN, 1986). Esta premissa é corroborada por um trabalho de Wishaw e Mittlelman (1986), no qual eles demonstraram que ratos testados na versão pista distal do LAM foram capazes de utilizar eficientemente estratégias de navegação espacial para solucionarem a tarefa e que os padrões de navegação analisados nas tentativas de *probe* indicaram que houve repetição de comportamentos anteriormente reforçados, como nadar de

³O'KEEFE, J. B.; NADEL, R. **The Hippocampus as a cognitive map**. Oxford, England. Clarendon, 1978.

volta para as posições de onde eles eram liberados na borda do tanque e a partir destes pontos, reconstruir as rotas aprendidas. Entretanto, neste trabalho, os autores também consideram a utilização de inúmeras estratégias de navegação espacial sendo usadas simultaneamente, ou seja, os animais não apenas utilizariam estratégias de navegação por mapeamento cognitivo, mas também fariam uso de estratégias de navegação egocêntricas para a resolução do problema-tarefa.

Os resultados apresentados revelaram prejuízos sutis, porém significativos tanto de memória operacional quanto de memória de referência nos quatro grupos desnutridos, na tarefa do LAM. Entretanto, estes prejuízos foram específicos para cada técnica de desnutrição utilizada.

Ratos desnutridos por separação temporária, grupo DS, tiveram maiores latências de fuga, distâncias navegadas e ângulos de movimento de rotação na segunda sessão, quando comparados ao grupo CS, cujas curvas de aprendizagem apresentaram declínios mais graduais e contínuos ao longo das tentativas. As curvas de aprendizagem do grupo DS apresentaram alguns picos no segundo e terceiro dias, com aumentos significativos na primeira e na segunda tentativa da segunda sessão. Essas são evidências de prejuízos de memória de referência, uma vez que as informações previamente adquiridas ou não foram adequadamente retidas ou não foram eficientemente evocadas levando a uma busca extensiva pela posição da plataforma.

Os ratos do grupo DPC apresentaram curvas de aprendizagem semelhantes às daquelas do grupo C, na fase de aprendizagem. Todavia, no teste de retenção de memória, na única tentativa realizada 28 dias após a fase de aquisição da aprendizagem, ratos DPC tiveram maiores latências, distâncias navegadas e ângulos de movimento de rotação; estes dados são indicativos de prejuízo de memória de referência. O período de tempo transcorrido entre a última tentativa da fase de aprendizagem e a tentativa realizada no teste de retenção de memória ocasionou efeitos deletérios sobre o aprendizado prévio, pois revelou prejuízos no processo de consolidação e/ou evocação das informações armazenadas, embora não tenham sido verificados prejuízos no desempenho destes animais na fase de aquisição da aprendizagem da tarefa. Estes dados indicam, portanto, que a memória operacional não sofreu prejuízos decorrentes do tipo de desnutrição imposta.

Em relação aos ratos DP, foram evidenciados picos nas curvas de aprendizagem após a primeira sessão, comparados aos ratos C, indicando um déficit significativo na evolução do desempenho destes animais, fator intrínseco ao processo natural de aprendizagem, correspondente à memória operacional (considerando-se uma mesma sessão experimental) e à

memória de referência (entre uma e outra sessão experimental). Conquanto nenhum efeito de interação tenha sido revelado pela análise estatística, pôde-se verificar um declínio mais lento nas curvas de aprendizagem de ratos DP, comparados aos C, para latência de fuga e distância navegada. A desnutrição protéica precoce tem sido amplamente estudada e, por esse motivo, déficits de memória e aprendizagem têm sido frequentemente reportados em ratos desnutridos (FUKUDA; FRANÇOLIN-SILVA; ALMEIDA, 2002; FUKUDA et al., 2007; HEMB; CAMMAROTA; NUNES, 2010; LUKOYANOV; ANDRADE, 2000; VALDARES; ALMEIDA, 2005; VALDARES et al., 2010; ZHANG; LI; YANG, 2010). Contudo, a desnutrição protéica imposta apenas durante o período de lactação parece não provocar danos severos sobre os processos de aprendizagem e memória espacial em animais testados nesse modelo (BEDI, 1992).

Do mesmo modo que os demais grupos desnutridos, ratos do grupo DGN apresentaram curvas de aprendizagem com declínios menos graduais e alguns picos nas sessões que sucederam a primeira, comparados ao grupo C, tanto para latência de fuga quanto para distância navegada. Estes dados indicaram que houve déficits de memória operacional e de referência, uma vez que as informações anteriormente adquiridas não foram predominantes em melhorar de maneira substancial o desempenho desses animais nas tentativas e sessões subsequentes.

Tomando-se como embasamento teórico estudos prévios de investigação de estratégias de navegação espacial em ratos lesionados no hipocampo, pode-se sugerir que os prejuízos observados em ratos desnutridos seguem os mesmos padrões de alterações funcionais observados nesses animais lesionados (COSTA; BUENO; XAVIER, 2005; XAVIER; OLIVEIRA-FILHO; SANTOS, 1999; XAVIER; COSTA, 2009), isto é, os ratos demonstraram prejuízos de desempenho na tarefa de aprendizagem do LAM, na versão pista distal com plataforma fixa do teste, indicando dificuldades em desempenhar estratégias de navegação espacial. Por outro lado, ratos lesionados apresentaram melhoras no desempenho por meio de estratégias egocêntricas de orientação, após treino repetido (XAVIER; OLIVEIRA-FILHO; SANTOS, 1999). Estes resultados podem elucidar as razões pelas quais ratos desnutridos apresentaram melhora no desempenho, verificada nas últimas tentativas de cada sessão, alcançando, na quarta e última sessão, desempenhos semelhantes àqueles apresentados por ratos do grupo controle.

No LRA, a redução do número de erros e do tempo total gasto por sessão para a realização da tarefa no decorrer das sessões indica um processo de aprendizagem. No entanto, foi possível verificar que todos os animais de todos os grupos experimentais foram capazes de

aprender a tarefa, como verificado pela redução do número de erros tanto de memória operacional quanto de memória de referência e redução do tempo gasto entre as sessões do teste.

O desempenho ideal na tarefa do LRA requer que os animais aprendam a evitar os braços nunca reforçados por plataformas de fuga (memória de referência) e visitem apenas uma vez os braços que tenham plataformas de fuga (memória operacional). Desse modo, os animais deveriam aprender a distinguir entre braços reforçados e braços não reforçados para realizar a tarefa satisfatoriamente. Haveria então uma redução substancial no número de erros, demonstrando que os animais foram capazes de aprender a tarefa.

Em conformidade com a inferência acima mencionada, nossos resultados indicaram redução do número de erros e redução do tempo gasto para realização da tarefa no transcorrer das sessões, em todos os grupos, revelando que eles foram capazes de solucionar a tarefa melhorando seus desempenhos conforme o treino foi repetido. Apenas ratos do grupo DP apresentaram desempenho diferente de C, em duas sessões iniciais. Os ratos desnutridos tiveram menos erros de memória operacional (EMOI) na segunda sessão e gastaram menos tempo para completar a tarefa na segunda e na quarta sessão. Entretanto, esse efeito não foi persistente indicando que todos os animais foram capazes de solucionar a tarefa, apresentando melhora no desempenho entre cada sessão do teste sem que quaisquer prejuízos fossem demonstrados.

De acordo com a premissa de O'Keefe e Nadel (1978⁴ apud WISHAW; MITTLEMAN, 1986), tarefas como o LRA requerem a utilização de estratégias espaciais de navegação (atribuídas ao hipocampo) para sua resolução. Porém, os animais seriam capazes de solucioná-las usando também estratégias egocêntricas de orientação e direcionamento. Esta hipótese pode ser corroborada por resultados mais recentes, os quais demonstraram uma melhora no desempenho de ratos lesionados no hipocampo após repetições extensivas das sessões, possibilitando que estes animais alcançassem os mesmos níveis de desempenho de ratos controles (COSTA; BUENO; XAVIER, 2005). Os autores atribuíram este efeito à utilização de estratégias de orientação egocêntricas. A mesma hipótese parece ser plausível para explicar os resultados aqui apresentados. Em consonância com o pressuposto de que a desnutrição precoce consiste em um insulto capaz de produzir alterações funcionais, neuroquímicas ou morfológicas no hipocampo, no córtex cerebral e nos sistemas de neurotransmissão envolvidos nos processos de aquisição, consolidação e evocação das

⁴ O'KEEFE, J. B.; NADEL, R. **The Hippocampus as a cognitive map**. Oxford, England. Clarendon, 1978.

memórias (BEDI, 1991; CINTRA et al., 1990; FEOLI, et al., 2006; FUKUDA et al., 2007; GALLER; SHUMSKY; MORGANE, 1995; JORDAN; CLARK, 1993; LUKOYANOV; ANDRADE, 2000; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002; ZHANG; LI; YANG, 2010) e dificuldades de aprendizagem associados a déficits de memória em tarefas espaciais dependentes da função hipocampal (FUKUDA et al., 2007; LUKOYANOV; ANDRADE, 2000; ZHANG; LI; YANG, 2010), foram verificados, nos resultados apresentados no presente trabalho, prejuízos de memória operacional e de referência na tarefa de aprendizagem do LAM. Contudo, na tarefa de aprendizagem do LRA todos os animais foram capazes de realizar a tarefa utilizando estratégias egocêntricas de orientação e direcionamento, explicando o desempenho satisfatório de todos os grupos experimentais.

6. CONCLUSÕES

Em suma, os resultados apresentados evidenciaram que a desnutrição protéica precoce prejudicou o desenvolvimento físico dos filhotes, causando déficit de crescimento e menor ganho de peso corporal.

A desnutrição protéica precoce também produziu déficits de aprendizagem e de memória operacional e de referência em tarefas dependentes de estratégias espaciais (mapeamento cognitivo) de exploração, entretanto, não evidenciados em uma tarefa solucionável por estratégias de navegação de orientação egocêntrica.

Os danos causados pela desnutrição precoce sobre os processos de aprendizagem e memória na idade adulta foram sutis e específicos a cada técnica de desnutrição utilizada e à complexidade de cada tarefa, em contraste aos danos acentuados produzidos no desenvolvimento físico dos filhotes.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. S.; DE OLIVEIRA, L. M.; GRAEFF, F. G. Early protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity of anxiolytics. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 513-518, 1991.
- ALMEIDA, S. S.; DE-OLIVEIRA, L. M. Acquisition and extinction of jumping, two-way shuttle-box and bar press avoidance responses in malnourished rats: effects of shock intensity. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 10, p. 2443-2452, 1994.
- ALMEIDA, S. S. et al. The ontogeny of exploratory behaviors in early protein-malnourished rats exposed to the elevated plus-maze. **Psychobiology**, v. 22, p. 283-288, 1994.
- ALMEIDA, S. S. et al. Effects of early postnatal malnutrition and chlordiazepoxide on experimental aversive situations. **Physiology and Behavior**, v. 51, p. 1195-1199, 1992.
- ALMEIDA, S. S.; TONKISS, J.; GALLER, J. R.; Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 20, p. 389-402, 1996.
- BARNES, R. H. et al. Influence of nutritional deprivations in early life on learning behavior of rats as measured by performance in a water maze. **Journal of Nutrition**, v. 89, p. 399-410, 1966.
- BARNES, R. H. et al. Postnatal nutritional deprivations as determinants of adult rat behavior toward food, its consumption and utilization. **Journal of Nutrition**, v. 96, p. 467-476, 1968.
- BEDI, K. S. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 311, p. 425-433, 1991a.
- BEDI, K. S. Spatial Learning Ability of Rats Undernourished During Early Postnatal Life. **Physiology and Behavior**, v. 51, p. 1001-1007, 1992.
- BURESOVÁ, O. et al. Radial Maze in the water tank: an aversively motivated spatial working memory task. **Physiology and Behavior**, v. 34, p. 1003-1005, 1985.
- CAMBRAIA, R. P. B.; VANNUCCHI, H.; DE OLIVEIRA, L. M. Foods intake and weight of lactating rats maintained on different protein-calorie diets, and pup growth. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 30, p. 985-988, 1997.
- CAMPBELL, L. F.; BEDI, K. S. The effects of undernutrition during early life on spatial learning. **Physiology and Behavior**, v. 45, p. 883-890, 1989.
- CASTRO, C. A.; TRACY, M.; RUDY, J. W. Early life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory process mediating performance in a conditional-spatial discrimination task. **Behavioural Brain Research**, v. 32, p. 255-264, 1989.
- CINTRA, L. et al. Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. **Brain Research**, v. 532, p. 271-277, 1990.

- COSTA, V. C. I.; BUENO, J. L. O.; XAVIER, G. F. Dentate gyrus-selective colchicines lesion and performance in temporal and spatial tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 160, p. 286-303, 2005.
- CRNIC, L. S.; CHASE, H. P. Models of infantile malnutrition in rats: effects on milk. **Journal of Nutrition**, v. 108, p. 1755-1760, 1978.
- CRNIC, L. S. Models of infantile malnutrition in rats: effects on maternal behavior. **Developmental Psychobiology**, v. 13, p. 615-628, 1980.
- D'HOOGE, R.; DE DEYN, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews**, v. 36, p. 60-90, 2001.
- FEOLI, A. M. et al. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rats brain. **Nutrition**, v. 22, p. 160-165, 2006.
- FLEISCHER, S. F.; TURKEWITZ, G. Alterations of maternal behaviors of female rats caring for malnourished pups. **Developmental Psychobiology**, v. 14, n. 4, p. 383-388, 1981.
- FRANKOVÁ, S. Influence of nutrition and early experience on behavior of rats: a review. **Biblioteca Nutritio et Dieta**, v. 17, p. 96-110, 1972.
- FUKUDA, M. T. H.; FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; ALMEIDA, S. S. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. **Behavioural Brain Research**, v. 133, p. 271-277, 2002.
- FUKUDA, M. T. H. et al. Effects of early protein malnutrition and scopolamine on learning and memory in the Morris water maze. **Nutritional Neuroscience**, v. 10, n. 5-6, p. 251-259, 2007.
- GALLER, J. R.; SHUMSKY, J. S.; MORGANE, P. J. Malnutrition and brain development. In: Walker, W. A. and Watkins, J. (Eds.) **Nutrition in Pediatrics**. 2nd edition. France: Plenum Press, p. 194-210, 1995.
- GEORGIEFF, M. K.; Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 614-620, 2007.
- GROTA, L. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behavior in the rat. **Animal Behaviour**, v. 17, p. 722-729, 1969.
- HALL, R. D. Is hippocampal function in the adult rat impaired by early protein or protein-calorie deficiencies? **Developmental Psychobiology**, v. 16, p. 395-411, 1983.
- HEMB, M.; CAMMAROTA, M.; NUNES, M. L. Effects of early malnutrition, isolation and seizures on memory and spatial learning in the developing rat. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, p. 303-307, 2010.
- HERNANDES, A. S. et al. Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 162, p. 240-245, 2005.

HYDE, L.; SHERMAN, G.; DENENBERG, V. Radial-arm maze learning in BXSB mice: effects of neocortical ectopias. **Neuroscience Abstracts**, v. 22, p. 485, 1996.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, p. 285-316, 1997.

JAISWAL, A. K. et al. Comparative effects of prenatal and postnatal undernutrition on learning and memory. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, p. 17-22, 1999.

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

JORDAN, T. C.; CLARK, C. A. Early undernutrition impairs hippocampal long-term potentiation in adult rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 87, p. 319-322, 1983.

LAUS, M. F. et al. Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: A review of human and animal studies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 590-612, 2011.

LEVITSKY, D. A.; BARNES, R. H. Effects of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli. **Nature**, v. 25, p. 468-469, 1970.

LEVITSKY, D. A.; STRUPP, B. J. Malnutrition and the Brain: Changing concepts, changing concerns. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2212S-2220S, 1995.

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

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

MORGANE, P. J. et al. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 2, p. 137-230, 1978.

MORGANE, P. J. et al. Prenatal Malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91-128, 1993.

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

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

MORRIS, R. G. et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, p. 681-683, 1982.

- MYHRER, T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. **Brain Research Reviews**, v. 41, p. 268-287, 2003.
- NADEL, L.; MACDONALD, L. Hippocampus: cognitive map or working memory? **Behavioral and Neural Biology**, v.29, p. 405-409, 1980.
- OLTON, D. S. Mazes, maps and memory. **American Psychology**, v. 34, p. 583-596, 1979.
- OLTON, D. S.; PAPAS, B. C. Spatial memory and hippocampal function. **Neuropsychologia**, v. 17, p. 669-682, 1979.
- OLTON, D. S. Memory functions and the hippocampus. In: SEIFERT, W., editors. **The Neurobiology of Hippocampus**. London: London Academic Press, 1983, p. 335-373.
- OLTON, D. S.; BECKER, J. T.; HANDELMANN, G. E. Hippocampus, space and memory. **Behavioral Brain Sciences**, v. 2, p. 313-366, 1979.
- OLTON, D.; SAMUELSON, R. Remembrance of places passed: spatial memory in rats. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 2, p. 97-116, 1976.
- PASSOS, M. C. F.; RAMOS, C. F.; MOURA, E. G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, v. 20, n. 11, p. 1603-1612, 2000.
- PINE, A. P.; JESSOP, N. S.; OLDHAM, J. D. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats: The effect of dietary protein restriction and stage of lactation on milk composition. **Brazilian Journal Nutrition**, v. 72, p. 815-830, 1994.
- PRUSKY, G. T. et al. Visual memory task for rats reveals an essential role for hippocampus and perirhinal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 5064-5068, 2004.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. J. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report for the American Institute of AIN-76 rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 25, p. 835-853, 2001.
- RIUL, T. R. et al. Ethological analysis of mother-pup interactions and other behavioral reactions in rats: effects of malnutrition and tactile stimulation of the pups. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 975-983, 1999.
- ROCINHOLI, L. F.; ALMEIDA, S. S.; DE-OLIVEIRA, L. M. Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 407-413, 1997.

- SANTUCCI, L. B. et al. Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 2, p. 393-398, 1994.
- SCHENK, F. MORRIS, R. G. Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. **Experimental Brain Research**, v. 58, n. 1, p. 11-28, 1985.
- SMART, J. L.; DOBBING, J. Increased thirst and hunger in adult rats undernourished as infants: an alternative explanation. **British Journal of Nutrition**, v. 37, p. 421-430, 1977.
- SMART, J. L.; PREECE, J. Maternal behavior of undernourished mother rats. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 613-619, 1973.
- SMART, J. L.; WATSON, T.S.; DOBBING, J. Thresholds of response to electric shock in previously undernourished rats. **British Journal of Nutrition**, v. 34, p. 511-516, 1975.
- SQUIRE, L. R. Definitions: From Synapses to Behavior. In: SQUIRE, L. R. **Memory and Brain**. New York: Oxford University Press, 1987. Cap. 1, p. 3.
- VAN DER STAAY, F. J. et al. The cone field: a spatial discrimination task for the automatic and simultaneous assessment of working memory in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 31, p. 13-22, 1990.
- STRUPP, B. J.; LEVITSKY, D. A. Enduring effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 2221-2232, 1995.
- TONKISS, J.; GALLER, J. R. Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 40, p. 95-107, 1990.
- TONKISS, J.; SHULTZ, P.; GALLER, J.R. An analysis of spatial navigation in prenatally protein malnourished rats. **Physiology and Behavior**, v. 55, n. 2, p. 217-224, 1994.
- VALADARES, C. T.; ALMEIDA, S. S. Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water-maze. **Nutritional Neuroscience**, v. 8, p. 39-47, 2005.
- VALADARES, C. T. et al. Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. **Nutritional Neuroscience**, v. 13, p. 274-282, 2010.
- XAVIER, G. F., COSTA, V. C. I. Dentate gyrus and spatial behaviour. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, p. 762-773, 2009.
- XAVIER, G. F.; OLIVEIRA-FILHO, F. J. B.; SANTOS, A. M. G. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in 'place strategy' because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? **Hippocampus**, v. 9, p. 668-681, 1999.

WHISHAW, I. Q.; MITTLEMAN, G. Visits to starts, routes, and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. **Journal of Comparative Psychology**, v. 100, n. 4, p. 422-431, 1986.

WOLF, C. et al. Behavioral effects of severe and moderate early malnutrition. **Physiology and Behavior**, v. 38, n. 5, p. 725-730, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Severe Acute Malnutrition. **Nutrition health topics**. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/topics/malnutrition/en/index.html>. Acesso em: 20 Abr. 2012.

ZHANG, Y.; LI, N.; YANG, Z. Perinatal food restriction impaired spatial learning and memory behavior and decreased the density of nitric oxide synthase neurons in the hippocampus of adult male rat offspring. **Toxicology Letters**, v. 193, p. 167-172, 2010.

APÊNDICE A – Artigo apresentado no exame de Qualificação de Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Psicologia

Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

Laboratório de Nutrição e Comportamento

“Early malnutrition injuries on learning and memory in adulthood are dependent of nutritional technique and task complexity”.

Aluno: Lucas Duarte Manhas Ferreira do Vales

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida

Artigo apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia como parte das exigências para o exame de Qualificação de Doutorado.

Ribeirão Preto – SP

2011

Early malnutrition injuries on learning and memory in adulthood are dependent of nutritional technique and task complexity.

Authors: L.D.M.F. Vales, and S.S. Almeida*

Laboratory of Nutrition and Behavior, FFCLRP, University of São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil.

Keywords: Malnutrition, learning, memory, water maze tasks.

*Corresponding author: Tel: 55 16 3602 3663 Fax: 55 16 36335015

E-mail address: sebasalm@usp.br

Number of text pages: 25

Number of Tables: 2

Number of figures: 8

Early malnutrition injuries on learning and memory in adulthood are dependent of nutritional technique and task complexity.

Abstract

The effects of different early malnutrition techniques on learning and spatial memory processes in adult rats were evaluated in two water maze tasks. Animals were grouped into six different conditions according to treatment during lactation phase: control group (C), litters fed a normal protein diet *ad libitum*; protein malnourished group (PM), litters fed a low protein diet *ad libitum*; protein-calorie malnourished group (PCM), litters fed with 50% of the amount of diet ingested by C; malnutrition induced by an increase in the number of pups in the litters (LLM - twice the number of pups in C litters) fed a normal protein diet *ad libitum*; malnutrition induced by removal the pups from their dams half the day (RM), litters fed a normal protein diet *ad libitum*; control group for RM condition (CR), litters fed a normal protein diet *ad libitum*. C, CR, PM, PCM and RM litters were composed by eight pups each. RM litters were removed from their dams and kept 12 hours daily with a non-lactating female rat. After weaning, all groups were fed a lab chow. All malnourished groups showed learning and memory impairments in the Morris maze task. Nevertheless, only PM rats showed different performance in Radial-arm water maze. Compared to controls, PM rats had fewer working memory errors and spent less time to complete the sessions. Malnutrition insults on learning and memory in adulthood were tenuous and specific for each malnutrition technique, despite the pronounced physical damages. Our results suggest that early malnutrition leads to working and reference memory impairments in place-strategies dependent spatial task in the Morris maze but not in a spatial learning task in the Radial-arm water maze solvable by guidance and egocentric strategies either.

Keywords: Malnutrition, learning, memory, water maze tasks.

1. Introduction

Early nutrition in life represents a meaningful environmental factor to formation, growth and maturation of the central nervous system (CNS) and consequent cognition and adaptive behaviors. An insufficient or inadequate diet during the first life stages (e.g. gestation and lactation periods) is a well-known environmental injury related to behavioral changes in adulthood due to morphological, and functional brain alterations [Georgief, 2007, Levitsky, Strupp, 1995, Morgane et al., 2002].

Severe or long lasting malnutrition during prenatal period or in the beginning of life, throughout critical periods of CNS development, produces some significant and enduring behavioral changes which can be observed in the course of a lifetime, as cognitive impairments, demonstrated in several studies in humans and rodents [for a review see Laus et al., 2011].

Hence, malnutrition's time length and severity are determinant to the magnitude and endurance of its effects on CNS development and on later behavioral changes. There are some different and effective malnutrition techniques used in rats and all those introduced during lactation phase cause damages in pup's growth and development since the quality and amount of milk supply is reduced as a consequence of maternal diet deficiency [Crnic, Chase, 1978; Passos et al., 2000; Pine et al., 1994]. Protein malnutrition can be produced by a low-protein diet as a decrease of protein amount in diet composition; protein calorie malnutrition is an insufficient or inadequate amount of diet available; large litter malnutrition is occasioned by increasing litter's size which leads to an increased competition for food and mother's care; and malnutrition by removal of the pups from the dams for a period of time during the day which causes food deprivation of pups [Crnic, 1980]. These are resourceful techniques which are efficient in producing significant effects both on physical and behavioral developments as previously demonstrated by our group [Hernandes et al., 2005].

According to several studies conducted over the past decades, the most significant behavioral changes related in prenatal and postnatal malnourished rats leads to emotional reactivity and sensitivity to aversive or painful stimuli [Almeida et al., 1992; Almeida, De-Oliveira, 1994; Levitsky, Barnes, 1970; Rocinholi et al., 1997; Smart et al., 1975], higher impulsiveness associated to lower anxiety [Almeida et al., 1991; 1994; Hernandez et al., 2005; Santucci et al., 1994], reduction in cognitive flexibility [Strupp, Levitsky, 1995], learning disabilities and memory impairments [Barnes et al., 1966; Fukuda et al., 2002; 2007; Valadares et al., 2005; 2010; Zhang, Yang, 2010].

The CNS is strongly vulnerable to protein and protein-calorie malnutrition during its entire period of development [Galler et al., 1995; Levitsky, Strupp, 1995; Morgane et al., 2002]. Early severe malnutrition produces neurochemical, neurophysiological and functional changes in SNC and consequent development patterns distortions in some brain regions some structures whose development continues after birth (i.e. hippocampus, olfactory bulb and cerebellum) [Almeida et al., 1996; Morgane et al., 1993].

The hippocampal formation is particularly affected by early protein or protein-calorie malnutrition because its neurogenesis begins in prenatal period and continues throughout postnatal period reaching one of its growth and development spurts during this last stage [Morgane et al., 2002]. Most behavioral alterations in malnourished rats associated to learning and memory impairments are due to neurochemical, functional or morphological changes in the hippocampus and neocortex as a consequence of early severe malnutrition. These premises are supported by researches while showing learning disabilities and memory deficits in spatial [Xavier et al., 1999, Costa et al., 2005] and non-spatial [Prusky et al., 2004] memory tasks after hippocampal lesions.

Learning and memory processes are essential for the organism survival under certain environmental conditions. Memory has the basic function of storing information. Stored information once undergoes a continuous process of categorization so that, in due course, it can be recovered.

According to cognitive map theory proposed by O'Keefe and Nadel [1978] the hippocampus is required in learning processes and environmental cognitive representation storage into cognitive maps. An object, a cue or a place is new or strange to the animal if it is not represented in a cognitive map. Animals are able to explore the environment using place, guidance and egocentric orientation strategies to solve spatial tasks. However, hippocampal function would be overweight to place strategies' use only.

Learning and spatial memory processes have been widely investigated in malnourished rats using different procedures and tests, such as radial maze [Hall, 1983; Jordan et al., 1981], T maze [Castro et al., 1989; Wolf et al., 1986], Radial-arm water Maze (RAWM) [Hyde et al., 1996] and, most frequently used, the Morris water maze (MWM) [Bedi, 1992; Fukuda et al., 2002; 2007; Hemb et al., 2010; Huang et al., 2003; Tonkiss et al., 1994; Valadares et al., 2005; 2010; Zhang et al., 2010].

The MWM was developed in order to investigate orientation and spatial memory in rats [D'Hooge, De Deyn, 2001; Wishaw, Mittleman, 1986]. RAWM was derived from the ground radial maze developed by Olton and Samuelson [1976]. Radial maze's technique has

been used as a standard tool to investigation of spatial working memory in rats [Olton et al., 1979; Olton, 1983]. Hyde, Sherman and Denenberg [1996] developed a simplified water radial maze (non-automated), in which mice were able to learn easily. This non-automated version allowed the study of working and reference memory simultaneous. The main idea of water maze tasks is related to escape from water through negative reinforcement.

Water maze tests are particularly preferred to study early malnutrition because no food reward is required, once food reward could be a confounding variable when testing animals malnourished in the beginning of life. In addition, any kind of food reward could serve as a visual and/or olfactory cue which may produce a different motivated response in malnourished animals [Barnes et al., 1968].

Although changes in behavioral patterns following early protein malnutrition have been noticed in several animals' researches, mainly in rats, in the past 50 years [for more extensive reviews see Levitsky, Strupp, 1995, Morgane et al., 2002], there are few studies of postnatal protein malnutrition and its effects on cognition [Laus et al., 2011]. Moreover, learning and memory is still a controversial subject in malnourished animals.

Therefore, the aim of this work was to analyze the effects of four different malnutrition techniques on learning and memory processes of rats compared to well-nourished ones in two water mazes models of learning and spatial (working and reference) memory.

2. Material and Method

2.1 Animals and Diet

Sixty-eight male Wistar rats from the Central Animal Facilities in the Campus of Ribeirão Preto city, University of São Paulo (USP) were used. The study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA – Protocol 08.1.1279.53.9) of the Campus of Ribeirão Preto city. The rats were received on the day of birth and divided into groups of litters of 8 pups each (6 males and 2 females) plus the dam.

Throughout the lactation phase, litters were housed in 41 x 34 x 16 cm polypropylene cages lined with wood chips and covered with a wire mesh lid. During this period, each litter was randomly assigned in control or experimental groups as described in Experimental Design (2.2). Animals were weaned at 21 days and male rats were housed in pairs, in cages of the same size and material described above, and fed the same diets until the end of the experiments. Only male rats were tested in learning and memory tests because females exhibit estrous cycle, a variable which we chose to exclude. The period between the weaning and the

end of the tests corresponded to the nutritional recovery period for the early malnourished rats. Dams were housed and treated in the Central Animal Facilities of the Campus of Ribeirão Preto city and they were fed lab chow and water *ad libitum* all through the period prior to pregnancy.

During the experiments, animals were housed and treated in the Nutrition and Behavior Animal Facilities under conditions of controlled temperature ($23^{\circ}\text{C} + 1$) and a 12 hour light/dark cycle. The rats were weighed every week, from the day of birth (day 0) until the end of the learning and memory tests (day 98).

The diets used were prepared as previously described [Barnes et al, 1968] and modified [Santucci et al, 1994], they were also based on the recommendations [Reeves et al, 1993] of the AIN-93 (American Institute of Nutrition) and AOAC (Association of Official Agriculture Chemists). The control diet consisted of 16% protein (casein), 69.8% cornstarch, 8% lipids (corn oil), 5% salt mixture, 1% vitamin mixture, 0.2% choline, and methionine (2g/kg casein). The low-protein diet consisted of 6% protein, 79.8% cornstarch and the same proportions of the remaining nutrients present in the control diet. After the weaning day control and malnourished rats started to receive a commercial lab chow (NUVILAB CR-1, Brazil), 22% protein, which was continued until the end of the tests (98 days of life).

2.2 Experimental Design

Litters were divided into six different experimental groups according to treatment conditions: Protein Malnourished Group (PM); Protein-calorie Malnourished Group (PCM); Large Litter Malnourished Group (LLM); Temporary Removal Malnourished Group (RM); Control Group (C) and Control Group for temporary removal malnourished pups (CR).

RM pups spent 12 hours daily with a non-lactating female rat and the rest of the time with their dams. The CR group pups were handled daily during the lactation period. The manipulations consisted on changing these animals' cage, along with their dams in the morning and returning them back to the home cage at the end of the day, at the same times in which RM pups were apart from their dams. Using this treatment procedure CR could be a suitable parameter for RM group.

Experimental design is outlined in Table 1.

Table 1: Experimental design.

Experimental Groups	Lactation Phase (0 - 21 days)		Post-weaning until the end of the tests (21 - 98 days)
C (n=12)	Control diet (16% protein), <i>ad libitum</i>	8 pups 24h with their dams	Lab chow, <i>ad libitum</i>
CR (n=10)		8 pups, handled daily 24h with their dams	
RM (n=12)		8 pups, handled daily 12h with their dams and 12h with a non-lactating female	
LLM (n=10)		16 pups 24h with their dams	
PCM (n=12)	50% control diet (16% protein) ingested by C	8 pups 24h with their dams	
PM (n=12)	Low protein diet (6 % protein), <i>ad libitum</i>		

Two behavioral tests were performed. At the age of 70 days, all animals were tested in the MWM and one week after the learning phase at 80 days of life all animals were tested in the RAWM. A final memory test was performed at 98 days in the MWM. After all experimental procedures animals were sacrificed by CO₂ inhalation and were sent to the Central Animal Facilities of the Ribeirão Preto Campus for incineration.

2.3 Test apparatus and procedures

2.3.1 Morris Water Maze

It was used a water maze similar to the model described by Morris [Morris, 1981]. The maze consisted on a circular fiberglass black tank of 150 cm in diameter and 39 cm high filled with water at a controlled temperature of 25° C (+ 1°C). The tank was divided into four imaginary quadrants numbered in a clockwise direction (quadrants 1, 2, 3 and 4). A black circular platform of 12 cm in diameter and 25 cm high was placed inside the tank in a fixed position in the center of one out of four imaginary quadrants (quadrant 1).

The pool was placed on a wood frame (50 cm above the floor) and the entire apparatus was placed in the center of a large room. Visual cues were presented in areas outside the tank such as figures on the walls, windows and door, to be used as distal learning cues for the rats. No close visual, olfactory or auditory cues were offered.

A video camera (AS-3 Tracker, San Diego, USA) was attached to the ceiling above the maze and connected to a computer Intel Pentium Dual Core 2.16GHz (LG – BRA) and a LED widescreen monitor 19” (LG – BRA) located in an adjacent room for the recording and monitoring of the experimental sessions.

The experimental sessions were recorded and monitored using the software Ethovision which enables the analysis of the experimental procedure by means of accurate navigation strategy: Distance Traveled, Heading, Turn Angle, Escape Latency and Swimming Speed, in each trial.

Learning phase: Before the first trial on the first test day each rat was placed on the platform for 60 seconds. After this time, the rat was placed with its back turned to the center of the tank in one of the four quadrants, except the one where the platform was located, and was allowed to swim for a period of 60 seconds in order to find the escape platform. The platform was left in the same location throughout the experiment. Six daily trials were held over four consecutive days. When the rat was unable to reach the platform within the established time it was removed from the water and placed on the platform. Trials were separated by 35 seconds and during this period the animal remained over the platform. The positions in which animals were released in each trial were determined at random in equal proportions.

Memory retention test: Four weeks after the end of this training phase, each rat was subjected to a single trial for the memory retention test (ability to recover and reuse the information processed in the first stage of the test). The rats were placed in the MWM in the quadrant diagonally opposite to the one containing the platform. In this trial each rat had 180 seconds to find the submerged platform.

2.3.2 Radial-arm Water Maze

The RAWM was built in galvanized steel, with removable arms and was placed into a large fiber glass pool of water (the same described in the Morris Water Maze test). The distance from the water level to the top of the maze was 9 cm. The pool was placed on a wood frame and the entire apparatus placed in the center of a large room, with salient extra-maze cues (as described before) to orient the navigation. The maze had hidden escape platforms built in translucent acrylic material (7 X 11 X 1 cm; 1 cm below the surface of the water) were placed at the end of four of the eight arms (12.7 X 29.7 X 43.7 cm) which radiate from a central area ($d = 49.1$ cm). The distance between the maze's arms is 5.6 cm, measured at the edge of the central area. The platform locations remained fixed throughout the experiment. There was never a platform in the arm where the rat was released and no platform in two adjacent arms. The session was recorded for a subsequent analysis using the same electronics described before.

Training procedure: At the first session (Day 1) each animal was released into the maze facing the end wall of START arm, and had 120 seconds to locate the platform. If the allotted time expired, the subject was guided to the nearest available platform. Once a platform was found the animal remained on it for 10 seconds, and was placed into an empty and clean cage for 90 seconds. During the interval, the just-chosen platform was removed from the maze. Then, the animal was placed back into the START arm and allowed to locate another platform. One session consisted on this sequence of events which were repeated until all four platforms are found, resulting in a total of four trials per session. Each subject was given on session a day for 12 consecutive days.

The analysis of animals' performance in the learning and memory task considered the working and reference memory errors quantified for each daily session. The errors were classified into three categories as described: 1) Working Memory Correct Errors (WMCE): the first and repeated entries into any arm from which the platform had been removed previously during that session; 2) Reference Memory Errors (RME): the first entries into any arm which had never contained a platform in the past; 3) *Working* Memory Incorrect Errors (WMIE): the repeated entries into any arm which had never contained a platform in the past (e.g., repeat entries into reference memory arms). Besides the errors, the Total Time per Session (time spent by each animal to locate the escape platform in each session) was also analyzed.

2.4 Data analysis

Pup's body weight during lactation and post-lactation periods were submitted to a two-factor (diet x day) ANOVA, considering the day factor as a repeated measure. Behavioral data were submitted to a two-factor (diet x trial or session) ANOVA, considering trial (MWM) or session (RAWM) as repeated factors. All analyses have been conducted between one control and one malnourished group. Post-hoc analyses were conducted using Newman-Keuls test ($p < 0.05$).

3. Results

3.1 Body weight

All malnourished litters had lower body weights as compared with control litters in weight measurements during the whole lactation period. RM litters had lower body weight as revealed by an effect of diet ($F_{(1,2)} = 129.3$, $p < 0.05$), day ($F_{(3,6)} = 600.6$, $p < 0.05$) and diet by day interaction ($F_{(3,6)} = 84.9$, $p < 0.05$). Post-hoc analysis revealed lower body weights of RM

litters as compared with CR litters in the first three weeks of life ($p<0.05$). LLM litter had also lower body weight as demonstrated by an effect of diet ($F_{(1,4)} = 41.4$, $p<0.05$), day ($F_{(3,12)} = 1581.6$, $p<0.05$) and diet by day interaction ($F_{(3,12)} = 12.4$, $p<0.05$). Post-hoc analysis showed lower body weights of LLM pups than compared with C group in the first and second weeks of life, the second and third weight measurement respectively ($p<0.05$). PM litters had lower body weights either as revealed by an effect of diet ($F_{(1,5)} = 723.4$, $p<0.05$), day ($F_{(3,15)} = 804.7$, $p<0.05$) and diet by day interaction ($F_{(3,15)} = 343.6$, $p<0.05$). PCM litters had also lower body weights in the weekly measurements as showed by an effect of diet ($F_{(1,5)} = 189.7$, $p<0.05$), day ($F_{(3,15)} = 1280.6$, $p<0.05$) and diet by day interaction ($F_{(3,15)} = 96.0$, $p<0.05$). Post-hoc analysis showed lower body weights of both PM and PCM litters in the first three weeks of life ($p<0.05$).

During the post-weaning period only LLM rats presented body weights similar to those verified in C rats. Rats of all other malnourished groups had lower body weights as compared to well-nourished in all measurements until the end of the experiments at 98 days of life. The analysis of RM compared to CR revealed an effect of diet ($F_{(2,21)} = 61.5$, $p<0.05$), day ($F_{(7,147)} = 1405.0$, $p<0.05$) and diet by day interaction ($F_{(7,147)} = 5.1$, $p<0.05$). PM rats had also lower weights as demonstrated by an effect of diet ($F_{(1,27)} = 75.3$, $p<0.05$), day ($F_{(7,189)} = 1960.0$, $p<0.05$) and diet by day interaction ($F_{(7,189)} = 5.5$, $p<0.05$). PCM rats body weights' analysis revealed an effect of diet ($F_{(1,22)} = 13.9$, $p<0.05$), day ($F_{(7,154)} = 1013.8$, $p<0.05$) and diet by day interaction ($F_{(7,154)} = 4.4$, $p<0.05$). RM, PM and PCM post-hoc analysis showed lower body weights compared to respective control groups in all measurement days through the post-weaning period and even on the 70th and the 98th days of life ($p<0.05$), respectively the beginning and the end of behavioral tests.

Body weights means of animals of the six experimental groups on lactation phase and post-weaning period are outlined in Table 2.

Table 2. Mean body weights of all experimental groups.

Experimental Group	Lactation Phase			Post-weaning Period	
	1 st week	2 nd week	3 rd week	70 th day	98 th day
C	201.3 ± 3.9	358.0 ± 4.9	591.8 ± 13.1	543.4 ± 21.4	647.1 ± 22.2
CR	200.5 ± 6.5	367.5 ± 14.5	654.5 ± 30.5	550.4 ± 12.8	636.7 ± 21.3
PM	132.0 ± 3.0 *	158.0 ± 9.5 *	181.3 ± 9.3 *	425.7 ± 6.6 *	527.0 ± 7.9 *
PCM	161.0 ± 5.5 *	249.0 ± 7.9 *	370.3 ± 11.8 *	474.8 ± 12.8 *	560.7 ± 13.9 *
LLM	118.88 ± 2.3 *	307.68 ± 2.6 *	568.72 ± 2.9	511.7 ± 20.5	635.3 ± 26.1
RM	112.5 ± 2.5 #	192.5 ± 11.5 #	331.0 ± 3.0 #	443.8 ± 11.9 #	542.6 ± 13.7 #

Body weight (Mean ± SEM); * $p<0.05$ compared to C; # $p<0.05$ compared to CR.

3.2 Behavioral data

3.2.1 Morris Water Maze test

3.2.1.1 Learning Phase

MWM data revealed different effects for each evaluated parameter among malnourished groups compared to their respective controls. To access navigation strategies on swimming parameters we analyzed five behavioral navigation parameters: Escape Latency, Distance Traveled, Swimming Speed, Turn Angle and Heading. However, only Escape Latency, Distance Traveled and Turn Angle showed meaningful results concerning animals' performance.

RM rats Escape Latency's analysis revealed an effect of trial ($F_{(23,460)} = 13.5, p < 0.05$) and diet by trial interaction ($F_{(23,460)} = 4.1, p < 0.05$). Post-hoc analysis showed greater Escape Latency of RM group than compared to CR group on trials 7 and 8 ($p < 0.05$), respectively the first and the second trials of the second training day, Figure 1A. Distance Traveled analysis revealed an effect of trial ($F_{(23,460)} = 14.4, p < 0.05$) and diet by trial interaction ($F_{(23,460)} = 3.1, p < 0.05$). Post-hoc analysis showed greater Distance Traveled on trials 3, 7 and 8 to RM group ($p < 0.05$), Figure 2A. Turn Angle analyses revealed an effect of trial ($F_{(23,460)} = 8.0, p < 0.05$) and diet by trial interaction ($F_{(23,460)} = 2.4, p < 0.05$). Post-hoc showed greater Turn Angle values of RM group than compared to CR group on trials 7 and 8 ($p < 0.05$), Figure 3A.

PCM group Escape Latency (Figure 1B), Distance Traveled (Figure 2B), and Turn Angle (Figure 3B) analyses revealed only trial's effect ($F_{(23,506)} = 19.3, p < 0.05$), ($F_{(23,506)} = 20.6, p < 0.05$), ($F_{(23,506)} = 3.1, p < 0.05$) and ($F_{(23,506)} = 17.9, p < 0.05$), respectively.

PM group Escape Latency analysis revealed an effect of diet ($F_{(1,22)} = 4.4, p < 0.05$) with greater latencies of PM than compared to C group (Figure 1C) and an effect of trial ($F_{(23,506)} = 17.6, p < 0.05$). Distance Traveled analysis (Figure 2C) revealed an effect of diet ($F_{(1,22)} = 4.8, p < 0.05$) and trial ($F_{(23,506)} = 18.7, p < 0.05$). Turn Angle analyses revealed only effect of trial ($F_{(23,506)} = 17.5, p < 0.05$) (Figure 3C).

LLM rats Escape Latency's data (Figure 1D) revealed an effect of trial ($F_{(23,460)} = 15.7, p < 0.05$) and diet by trial interaction ($F_{(23,460)} = 1.5, p < 0.05$) with greater latencies to LLM. Likewise, Distance Traveled data (Figure 2D) revealed an effect of trial ($F_{(23,460)} = 14.9, p < 0.05$) and diet by trial interaction ($F_{(23,460)} = 1.6, p < 0.05$). Post-hoc analysis did not show significant differences between LLM and C group at the same trial of the same session for Escape Latency and Distance Traveled ($p < 0.05$) but LLM group had greater values on evaluated parameters. Turn Angle analyses revealed only trial effects, ($F_{(23,460)} = 14.7, p < 0.05$), Figure 3D.

Figure 1 – Escape latency (Mean $\pm$ SEM) in the 24 trials of the learning phase of MWM test. A: RM (n=12) compared to CR (n=10); B: PCM (n=12) compared to C (n=12); C: PM (n=12) compared to C (n=12); D: LLM (n=10) compared to C (n=12). * $p < 0.05$ compared to CR; # $p < 0.05$ compared to C, both according to Newman-Keuls test.

Figure 2 – Distance Traveled (Mean $\pm$ SEM) in the 24 trials of the learning phase of MWM test. A: RM (n=12) compared to CR (n=10); B: PCM (n=12) compared to C (n=12); C: PM (n=12) compared to C (n=12); D: LLM (n=10) compared to C (n=12). * $p < 0.05$ compared to CR; # $p < 0.05$ compared to C, according to Newman-Keuls test.

Figure 3 – Turn Angle (Mean $\pm$ SEM) in the 24 trials of the learning phase of MWM test. A: RM (n=12) compared to CR (n=10); B: PCM (n=12) compared to C (n=12); C: PM (n=12) compared to C (n=12); D: LLM (n=10) compared to C (n=12). * $p < 0.05$ compared to CR, according to Newman-Keuls test.

3.2.1.2 Probe Trial Test

There was no difference between malnourished and control groups regarding the time spent in target quadrant, nor as to the frequency of crossings in the area corresponding to the place where the platform remained. All groups spent more time in exploring the target quadrant, to the detriment of the other three quadrants – CS *vs* DS ($F_{(3,63)} = 27,49307$), C *vs* DP ($F_{(3,66)} = 92,51933$), C *vs* DPC ($F_{(3,66)} = 80,07327$) and C *vs* DGN ($F_{(3,63)} = 73,88607$); $p < 0,05$. Likewise, all groups showed similar frequencies of crossings in the area corresponding to the location of the platform – CS *vs* DS ($t_{(21)} = -0,715409$), C *vs* DP ($t_{(22)} = 0,808520$), C *vs* DPC ($t_{(22)} = 0,248514$) and C *vs* DGN ($t_{(21)} = -0,058165$); $p < 0,05$.

3.2.1.3 Memory Retention Test

Only PCM group showed differences on performance as compared to C in the memory retention test at 98 days. Escape Latency analysis revealed effects of diet ($F_{(1,22)} = 5.1$, $p < 0.05$) and trial ($F_{(1,22)} = 13.8$, $p < 0.05$), Figure 4A; Distance Traveled analysis showed also effects of diet ($F_{(1,22)} = 6.3$, $p < 0.05$) and trial ($F_{(1,22)} = 18.2$, $p < 0.05$) Figure 4B; as well as Turn Angle analysis showed diet ($F_{(1,22)} = 5.6$, $p < 0.05$) and trial ($F_{(1,22)} = 17.7$, $p < 0.05$) effects, Figure 4C.

Figure 4 – Escape latency (A), Distance traveled (B) and Turn Angle (C) (Mean $\pm$ SEM) in the memory retention test of MWM test of PCM (n=12) compared to C (n=12); * p <0.05 compared to C; # p <0.05 compared to the last trial of the learning phase (24th), both according to Newman-Keuls test.

3.2.2 Radial-arm Water Maze test

Data behavior in the RAWM showed performance differences only in PM group as compared to C. The other malnourished groups did not present differences when compared to controls. There were only trials' effects as revealed by the analysis of variance, showing an improvement on performances of all groups along the sessions of the test. This means that rats of all groups reduced the total number of errors and the total time per session to complete the task across sessions until the end of the experiment.

The analyses of RM group compared to CR revealed only trials' effects in RME (Figure 5A), WMIE (Figure 6A), WMCE (Figure 7A) and Total Time per Session (Figure 8A), respectively ($F_{(11,220)} = 2.7$, p <0.05), ($F_{(11,220)} = 6.0$, p <0.05), ($F_{(11,220)} = 2.9$, p <0.05) and ($F_{(11,220)} = 19.4$, p <0.05).

PCM group analyses also showed trials' effects in RME (Figure 5B), WMIE (Figure 6B), WMCE (Figure 7B) and Total Time per Session (Figure 8B), ($F_{(11,242)} = 8.4, p < 0.05$), ($F_{(11,242)} = 24.3, p < 0.05$), ($F_{(11,242)} = 10.1, p < 0.05$) and ($F_{(11,242)} = 37.9, p < 0.05$), respectively.

PM rats analyses revealed only trials' effects to RME (Figure 5C) and WMCE (Figure 7C), ($F_{(11,242)} = 6.0, p < 0.05$), ($F_{(11,242)} = 5.4, p < 0.05$), respectively. However, WMIE analysis revealed effect of trial ($F_{(11,242)} = 12.5, p < 0.05$) and diet by trial interaction ($F_{(11,242)} = 2.0, p < 0.05$). Similarly, Total Time per Session analysis showed effect of trial ($F_{(11,242)} = 20.7, p < 0.05$) and diet by trial interaction ($F_{(11,242)} = 3.6, p < 0.05$), respectively. Post-hoc analyses indicated less working memory errors and lower Total Time per Session of PM rats as compared to C ones in same sessions, Figure 6C and 8C, respectively.

LLM group analyses showed also trials' effects in RME (Figure 5D), WMIE (Figure 6D), WMCE (Figure 7D) and Total Time per Session (Figure 8D), ($F_{(11,220)} = 8.8, p < 0.05$), ($F_{(11,220)} = 16.8, p < 0.05$), ($F_{(11,220)} = 8.1, p < 0.05$) and ($F_{(11,220)} = 29.2, p < 0.05$), respectively.

Figure 5 – Reference Memory Errors (Mean ± SEM) in the RAWM test. A: RM (n=12) compared with CR (n=10); B: PCM (n=12) compared with C (n=12); C: PM (n=12) compared with C (n=12); D: LLM (n=10) compared with C (n=12).

Figure 6 – Working Memory Incorrect Errors (Mean $\pm$ SEM) in the RAWM test. A: RM (n=12) compared to CR (n=10); B: PCM (n=12) compared to C (n=12); C: PM (n=12) compared to C (n=12); D: LLM (n=10) compared to C (n=12). * $p < 0.05$ compared to C, according to Newman-Keuls test.

Figure 7 – Working Memory Correct Errors (Mean $\pm$ SEM) in the RAWM test. A: RM (n=12) compared to CR (n=10); B: PCM (n=12) compared to C (n=12); C: PM (n=12) compared to C (n=12); D: LLM (n=10) compared to C (n=12).

Figure 8 – Total Time per Session (Mean $\pm$ SEM) in the RAWM test. A: RM (n=12) compared to CR (n=10); B: PCM (n=12) compared to C (n=12); C: PM (n=12) compared to C (n=12); D: LLM (n=10) compared to C (n=12). * $p < 0.05$ compared to C, according to Newman-Keuls test.

4. Discussion

All malnutrition techniques used were proficient as demonstrated on pups' body weights during lactation phase. Malnourished litters had lower body weights than compared to control litters, during the whole lactation phase. Only LLM pups weighted as similar values as C pups at the third week of life, on weaning day. Likewise, just LLM group had body weight similar to C after weaning, in contrast to previous study from our group [Hernandes et al., 2005]. That was probably due to the possibility of those pups feeding themselves on adequate diet available since the second week of life, when they were able to explore the home cage freely and could share their dam's food, diminishing the need for competing for mother's nipples.

PM, PCM and RM groups had lower weights compared to C and CR, respectively, even after nutritional recovery until the end of experiments, as demonstrated before [Hernandes et al., 2005]. Such difference about the weight which lasted up to adult life may be explained by the fact that the body weight of adult rats is determined during the gestation and lactation periods, and it depends on the nutritional conditions existent during these periods [Barnes et al., 1968; Passos et al., 2000]. Preceding works described similar effects on body weights after postnatal protein malnutrition [Barnes et al., 1968; Hemb et al., 2010;

Hernandes et al., 2005; Passos et al., 2000; Pine et al., 1994; Valadares et al., 2010; Zhang; Yang, 2010].

Our findings indicated working and reference memory deficits in adult rats, in the MWM task, due to malnutrition imposed during the lactation phase, regardless of the technique used to produce early malnutrition and after a considerable length of nutritional recovery. Our group have already demonstrated learning disabilities, reference and working memory deficits of malnourished rats during learning acquisition and memory retention test in the MWM task [Fukuda et al., 2002; 2007; Valadares et al., 2005; 2010], both for malnutrition induced only on lactation phase and extended until 49 days of life. In addition, numerous prior studies have presented results about functional and morphological changes in the hippocampal formation as a consequence of early protein malnutrition straightly related to behavioral alterations and cognitive impairments [Austin et al. 1986; 1992; Bedi, 1991a, 1991b; Jordan; Clark, 1983; Lukoyanov; Andrade, 2000].

Nevertheless, no previous study has investigated learning performance, working and reference memory processes in these two different water maze tasks simultaneously as an attempt to understand later and long lasting effects of early malnutrition on navigation strategies of adult rats.

In order to investigate both working and reference memory in the MWM task we used the reference memory version of the task in which the hidden platform location was kept fixed throughout all training sessions. Rats could use acquired information from one daily session to another to solve the task and find the hidden platform. Thereby, learning consisted in spending less time, swimming smaller distances and move more precisely to the target quadrant across trials along the sessions [Wishaw, Mittleman, 1986; Xavier et al., 1999].

Throughout the training phase, rats were released from different starting points at the edge of the pool; thus, to perform successfully, rats should acquire precise information about the relative positions of the extra-maze cues and of the platform relative to these cues, using navigation based on place strategies, according to cognitive map theory [O'Keefe, Nadel, 1978]. Supporting this premise, Wishaw and Mittlelman demonstrated that rats were able to use all applicable strategies to solve spatial navigation tasks and that their search patterns on probe trials indicated both previously reinforced behaviors (swimming back to release points at the edge's maze) and novel unconditioned search behaviors (scanning other maze areas).

Our data revealed a tenuous but significant impairment of both working and reference spatial memory in the four malnourished groups in the MWM task. However, these impairments were specific to each malnutrition technique.

RM rats had higher escape latencies, greater distances traveled and greater turn angles on the second session, compared to CR which learning curves shapes decreased more gradually and continuous across trials. RM group learning curves presented some peaks on the second and the third day, with significant increases on the first and the second trials of the second session. These are evidences of reference memory impairments, since previous retained information was not efficiently evoked leading to extensive search for the platform position.

PCM group showed similar learning curves as compared to C at the learning phase. Nonetheless, in the memory retention test, the single trial performed 28 days after the learning phase PCM rats had greater escape latency, distance traveled and turn angle values, indicating a major reference memory impairment. The period of time between the last trial of the learning phase and the trial performed in the memory retention test led to deleterious effects on prior learning, revealing an impaired retention of previously stored information, despite no disabilities on previous learning.

PM rats had some peaks on their learning curves after the first daily session, indicating relevant disadvantages than compared to C rats on learning improvement due to naturally learning process. Despite no interaction effect has been revealed by the analysis, it can be easily observed a slower decrease on PM learning curves than compared to C for escape latency and distance values. Protein malnutrition has been widely studied and learning and memory deficits in protein malnourished rats have been reported more frequently [Fukuda et al., 2002; 2007; Hemb et al., 2010; Lukoyanov, Andrade, 2000; Valadares et al., 2005; 2010; Zhang; Yang, 2010]. Meanwhile, protein malnutrition induced just in the lactation phase apparently did not lead to quiet striking or lasting damages on learning and memory in animals tested in this model.

Finally, LLM group likewise the other malnourished groups, revealed a slower decrease and some peaks on sessions after the first test day than compared to C on escape latencies and on distance traveled learning curves. It also indicates working memory deficits once previous acquired information was not prevalent in substantially improving performance in the subsequent trials.

Based on previous studies concerning navigation strategies in hippocampus-lesioned rats we can suggest that the impairments observed in malnourished rats follows the same patterns of functional alterations observed in those lesioned rats [Costa et al., 2005; Xavier et al., 1999] i.e., rats showed impairments on learning performance at the reference memory version of the water maze task, indicating disabilities to perform place strategies. However,

lesioned rats improved performance relied on guidance and orientation strategies after repeated training [Xavier et al., 1999]. These results might explain the reason why malnourished rats showed an improvement at the final trials of each session reaching control group similar performances at the fourth session.

In the RAWM, the decrease in the number of errors and total time per session across the daily sessions indicates a learning process. Therefore, we can state that all animals of all groups were able to learn the task, once there was a decrease in the number of working and reference memory errors and in the time spent across sessions.

Optimal performance in the RAWM required that animals had successfully learned to avoid the arms that never had a platform (reference memory), and visit only once the arms that had an escape platform (working memory). Animals had to learn the distinction between reinforced and non-reinforced arms. After that, there was a substantial decrease in errors, thereby demonstrating that animals were able to dissociated reinforced and non-reinforced arms, that is, animals have learned the task.

In accordance with our results, there was a reduction in the number of errors and in the time spent to solve the task across sessions, in all groups, revealing that they were capable of solving the task improving their performance after repeated training. Interesting data were observed in PM performance as compared to C; malnourished rats had fewer WMIE on the second session and spent less time to complete the task on the second and on the third sessions. Meanwhile, no other significant difference was observed, indicating that all animals were able to learn the task with no relevant impairments showed.

According to O'Keefe and Nadel premises [1978], tasks like RAWM do not require the hippocampus for the use of place strategies to settle them, but animals would be able to solve these spatial tasks using guidance and orientation strategies only. This hypothesis can be supported by recent findings which revealed an improvement of hippocampus-lesioned rats after extensively repeated sessions, reaching controls level performances [Costa et al., 2005]. The authors attributed this effect to guidance strategy use. The same hypothesis seems to be plausible to elucidate our data. Once early malnutrition is known as an environmental injury capable of producing hippocampal alterations (functional, neurochemical or morphological) and learning and memory impairments in hippocampal-dependent spatial strategies tasks, we found working and reference memory deficits in the MWM task. However, in RAWM task, animals could solve the task using only guidance and egocentric orientations strategies, explaining similar succeed performance among all groups.

In conclusion, the present results evidenced that early protein malnutrition impaired physical development, causing growth deficit and reduction of body weight. Early protein malnutrition also produced learning disabilities, working and reference memory deficits in place strategies-dependent spatial task, but not in a spatial task practicable solved by guidance and egocentric orientation strategies either. Early malnutrition injuries on learning and memory in adulthood were tenuous and dependent of nutritional technique and task complexity, despite the pronounced physical damages.

Acknowledgments

This work was supported by research grants from CAPES-Brazil, CNPq-Brazil and FAPESP-Brazil.

References

- Almeida SS, Soares EG, Bichuette MZ, Graeff FG, De Oliveira LM. Effects of early postnatal malnutrition and chlordiazepoxide on experimental aversive situations. *Physiol Behav* 1992;51:1195–9.
- Almeida SS, De-Oliveira LM. Acquisition and extinction of jumping, two-way shuttle-box and bar press avoidance responses in malnourished rats: effects of shock intensity. *Braz J Med Biol Res* 1994;10:2443-2452.
- Almeida SS, Garcia RA, Cibien MMR, Araujo M, Moreira GMS, De Oliveira LM. The ontogeny of exploratory behaviors in early protein-malnourished rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychobiology* 1994;22:283–8.
- Almeida SS, De Oliveira LM, Graeff FG. Early protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity of anxiolytics. *Psychopharmacology* 1991;103:513-518.
- Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1996;20:389-402.
- Barnes RH, Cunnold SR, Zimmermann RR, Simmons H, MacLeod RB, Krook L. Influence of nutritional deprivations in early life on learning behavior of rats as measured by performance in a water maze. *J Nutr* 1966;89:399-410.
- Barnes RH, Neely CS, Kwong E, Labadan BA, Franková S. Postnatal nutritional deprivations as determinants of adult rat behavior toward food, its consumption and utilization. *J Nutr* 1968;96:467-476.
- Bedi KS. Spatial Learning Ability of Rats Undernourished During Early Postnatal Life. *Physiology and Behavior* 1992;51:1001-1007.

Castro CA, Trary M, Rudy JW. Early life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory process mediating performance in a conditional-spatial discrimination task. *Behavioural Brain Research* 1989;32:255-264.

Crnic LS, Chase HP. Models of infantile malnutrition in rats: effects on milk. *J Nutr* 1978;108:1755-1760.

Crnic LS. Models of infantile malnutrition in rats: effects on maternal behavior. *Developmental Psychobiology* 1980;13:615-628.

Costa VCI, Bueno, JLO, Xavier, GF. Dentate gyrus-selective colchicines lesion and performance in temporal and spatial tasks. *Behavioural Brain Research* 2005;160:286-303.

D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 2001;36:60-90.

Fukuda MTH, Françolin-Silva AL, Almeida SS. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. *Behavioural Brain Research* 2002;133:271-277.

Fukuda MT, Françolin-Silva AL, Hernandez AS, Valadares CT, Almeida SS. Effects of early protein malnutrition and scopolamine on learning and memory in the Morris water maze. *Nutr Neurosc* 2007;10(5-6):251-259.

Galler JR, Shumsky JS, Morgane PJ. Malnutrition and brain development. In: Walker WA, Watkins J, editors. *Nutrition in Pediatrics*. 2nd ed. France: Plenum Press; 1995, 194-210.

Georgieff MK. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2007;85:614-620.

Hall RD. Is hippocampal function in the adult rat impaired by early protein or protein-calorie deficiencies? *Developmental Psychobiology* 1983;16:395-411.

Hemb M, Cammarota M, Nunes ML. Effects of early malnutrition, isolation and seizures on memory and spatial learning in the developing rat. *Int J Dev Neurosci* 2010;28:303-307.

Hernandes AS, Françolin-Silva AL, Valadares CT, Fukuda MTH, Almeida SS. Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research* 2005;162:240-245.

Hyde L, Sherman G, Denenberg V. Radial-arm maze learning in BXSB mice: effects of neocortical ectopias. *Neuroscience Abstracts* 1996;22:485.

Huang LT, Lai MC, Wang CL, Wang CA, Yang CH, Hsieh CS, Liou CW, Yang SN. Long-term effects of early-life malnutrition and status epilepticus: Assessment by spatial navigation and CREB(Serine-133) phosphorylation. *Dev Brain Res* 2003;145:213-218.

Jordan TC, Cane SE, Howells KF. Deficits in spatial memory performance induced by early undernutrition. *Developmental Psychobiology* 1981;14:317-325.

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

Levitsky DA, Strupp BJ. Malnutrition and the Brain: Changing concepts, changing concerns. *The Journal of Nutrition* 1995; (125):2212S-2220S.

Levitsky DA, Barnes RH. Effects of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli. *Nature* 1970;25:468-9.

Lukoyanov NV, Andrade JP. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behavioural Brain Research* 2000;112:85-97.

Morgane PJ, Austin-Lafrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. Prenatal Malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1993;17(1):91-128.

Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2002;26(4):471-483.

Morris RGM. Spatial Localization Does Not Require the Presence of Local Cues. *Learning and Motivation* 1981;12:239-260.

O'Keefe JB, Nadel R. *The Hippocampus as a cognitive map*. Oxford:Oxford University Press; 1978.

Olton D, Samuelson R. Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 1976;2:97-116.

Olton DS. Memory functions and the hippocampus. In: Seifert W, editors. *The Neurobiology of Hippocampus*, London: London Academic Press; 1983: p. 335-373.

Olton DS, Becker JT, Handelmann GE. Hippocampus, space and memory. *Behavioral Brain Sciences* 1979;2:313-366.

Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition Research* 2000; 20(11):1603-1612.

Pine AP, Jessop NS, Oldham JD. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats: The effect of dietary protein restriction and stage of lactation on milk composition. *Brazilian Journal Nutrition* 1994;72:815-830.

Prusky GT, Douglas RM, Nelson L, Shabanpoor A, Sutherland RJ. Visual memory task for rats reveals an essential role for hippocampus and perirhinal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5064-8.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GCJ. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report for the American Institute of AIN-76 rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-1951.

Rocinho LF, Almeida SS, De Oliveira LM. Response threshold to aversive stimuli in stimulated early-protein malnourished rats. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:407–13.

Santucci LB, Daud MM, Almeida SS, De Oliveira LM. Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 1994;49(2):393-398.

Smart JL, Watson TS, Dobbing J. Thresholds of response to electric shock in previously undernourished rats. *Br J Nutr* 1975;34:511–6.

Strupp BJ, Levitsky DA. Enduring effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. *J Nutr* 1995;135:2221-2232.

Tonkiss J, Shultz P, Galler JR. An analysis of spatial navigation in prenatally protein malnourished rats. *Physiology and Behavior* 1994;55(2):217-224.

Whishaw IQ, Mittleman G. Visits to starts, routes, and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. *J Comp Psychol* 1986;100:422–31.

Wolf C, Almli CR, Finger S, Ryan S, Morgane PJ. Behavioral effects of severe and moderate early malnutrition. *Physiology and Behavior* 1986;38(5):725-730.

Valadares CT, Almeida SS. Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water-maze. *Nutr Neurosc* 2005;8:39-47.

Valadares CT, Fukuda MT, Françolin-Silva AL, Hernandez AS, Almeida SS. Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. *Nutr Neurosci* 2010;13:274-282.

Zhang Y, Li N, Yang Z. Perinatal food restriction impaired spatial learning and memory behavior and decreased the density of nitric oxide synthase neurons in the hippocampus of adult male rat offspring. *Toxicol Lett* 2010;193:167-172.

Xavier GF, Oliveira-Filho FJB, Santos AMG. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in ‘place strategy’ because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus* 1999;9:668–81.

ANEXO A - Protocolo de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 08.1.1279.53.9), intitulado: "Efeitos de Diferentes Técnicas de Desnutrição Protéica Precoce sobre os Processos de Aprendizagem e Memória Espacial em Ratos (*Rattus norvegicus*)", de autoria de **Lucas Duarte Manhas Ferreira do Vales** e de **Sebastião de Sousa Almeida**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 03.12.2008.

Ribeirão Preto, 3 de dezembro de 2008

 Presidente da CEUA
 Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

 Secretária da CEUA
 Maria Angélica Depiro