UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

Roberto de Oliveira Soares

**EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PÓS-NATAL NO
FUNCIONAMENTO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL
EM RATOS SUBMETIDOS AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL**

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

Ribeirão Preto

2013

Roberto de Oliveira Soares

**EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PÓS-NATAL NO
FUNCIONAMENTO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL
EM RATOS SUBMETIDOS AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL**

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

Área de Concentração: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Sousa
Almeida

Ribeirão Preto

2013

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Soares, Roberto de Oliveira

Efeitos da desnutrição proteica pós-natal no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos submetidos ao enriquecimento ambiental, 2013.

XX p.73 : il. ; 30cm

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 proteica precoce. 2. Enriquecimento ambiental. 3. Labirinto em cruz elevado. 4. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
- 5.hipocampo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Roberto de Oliveira Soares

“Efeitos da desnutrição proteica pós-natal no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos submetidos ao enriquecimento ambiental”

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.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, Paulo e Rute, que com amor incondicional, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida, pela orientação do presente trabalho e pela grande confiança depositada em mim durante este período.

A Profa. Dra. Lucila Leiko K. Elias, pela co-orientação, pela amizade, pelo respeito, pelo investimento, pela confiança, pelas orientações e pelas conversas que foram de fundamental importância nesta caminhada.

A Profa. Dra. (e amiga) Claudia Maria Padovan, que me ajudou de uma maneira, sem esperar nada em troca, que possibilitou quase toda a coleta de dados deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João-José Lachat, que mesmo entrando no final desta jornada, me ensinou com sua experiência e amizade, uma maneira mais correta de ver mais a fundo não só o fenômeno que estou estudando, como também olhar a ciência, de maneira geral, com outro olhar.

A Prof. Dra. Lucilla Maria Moreira Camargo Simões, pela assessoria científica do presente trabalho

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, pelas discussões e ajuda na própria “bancada”, que possibilitou o início do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Silvo Morato, ou apenas Silvio, que a cada café me ajudou-me a entender o comportamento sob outra perspectiva.

Aos meus pais, Paulo e Rute, que fizeram tudo o que se pode imaginar (e mais um pouco) para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos, San e Mau, que mesmo privado por muitos momentos de sua companhia, são os grandes membros da minha torcida organizada.

A Kízie, braço direito, ombro, olhar, sorriso, coração e metade.

Ao irmão Thiago, definitivamente, um verdadeiro irmão com quem pude contar em todos esses momentos.

Ao Hideki (Paulinho) que foi e sempre será um amigo.

Aos parceiros Diego Padovan e ao Rodrigo Rorato, que foram o braço esquerdo e direito nessa jornada.

Aos técnicos: Milene, Valci, Izilda e Rodrigo, que graças aos seus esforços e grande capacitação me ajudaram a obter o dado que me é tanto precioso.

A Renata Vicentini, pela amizade e grande ajuda em todo o período da pós-graduação

Ao pessoal do Laboratório de Nutrição e Comportamento pelas discussões, risadas, fofocas e ajuda no biotério.

Ao pessoal do Laboratório do Comportamento Exploratório pelo acolhimento provisório, pelas discussões e pela ajuda na coleta de dados.

Ao pessoal do Laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão pelas risadas, “pitacos” e grande ajuda na coleta de dados.

Ao pessoal do Laboratório Neuroendocrinologia pelas discussões, e ajuda na coleta e análise de dados.

Ao pessoal do Laboratório de Neuroanatomia pelo acolhimento na reta final e pela grande ajuda na coleta de dados

A minha família de Ribeirão: Eduardo, Nayara, Ju, Adriano, Rafa, Paty, Fauler e Jú, que são insubstituíveis na minha vida, que com sua irmandade e companheirismo fizeram meus dias mais alegres durante esse longo ano.

Ao Dudu, “prof.” Léo, Ruizinho, Hugão, Brunão, Ricardo e Rafa, agradeço a amizade, as piadas, saídas e risadas que foram fundamentais para passar por todo esse período turbulento do mestrado e doutorado.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante o período de doutorado.

O meus mais sinceros agradecimentos por participarem dessa etapa de minha vida

“Ó Deus de meus pais, eu te dou graças e te louvo, porque me deu sabedoria e força...”

Dn 2:23

Resumo

Ratos submetidos à desnutrição proteica apresentam elevada impulsividade e alterações em comportamentos de avaliação de risco no labirinto em cruz elevado (LCE). A desnutrição também pode influenciar a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Alterações causadas pela desnutrição podem ser parcialmente revertidas pela estimulação ambiental; animais desnutridos e submetidos ao enriquecimento ambiental apresentaram maior locomoção e exploração no LCE, comparados com animais de mesma condição de dieta e que não foram estimulados. Demonstrou-se também que a estimulação pode influenciar os níveis de corticosterona plasmática evidenciando uma alteração da sensibilidade do eixo HPA. Este trabalho tem o objetivo de comparar, em ratos desnutridos (M) e bem nutridos (C), os efeitos do enriquecimento ambiental (E) em relação às concentrações de corticosterona plasmática, expressão de receptores de glicocorticóides (GR) no hipocampo e o desempenho no LCE aos 36 dias de idade. Ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos de acordo com a dieta e subdivididos em subgrupos conforme a manipulação ambiental. A manipulação ambiental foi realizada no período de 8 a 35 dias (1 hora por dia). Após o teste no LCE os animais foram decapitados e tiveram o sangue coletado e o cérebro removido. Para a análise de corticosterona plasmática foi utilizada a técnica de radioimunoensaio. Para a quantificação dos receptores (GR) no hipocampo foi realizada uma análise quantitativa de expressão gênica por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Ratos M apresentaram menor peso corporal quando comparados com os ratos C ($p < 0,001$). Em relação ao LCE, ratos M permaneceram uma maior porcentagem de tempo [$F_{(1,44)}=9,08$; $p < 0,01$] e entraram mais [$F_{(1,44)}=9,01$; $p < 0,01$] nos braços abertos em relação a C. Animais ME apresentaram porcentagem de tempo nos braços abertos ($6\% \pm 2\%$) próxima àquela dos animais CN ($8\% \pm 2\%$). De acordo com a PCR em tempo real, o teste do LCE alterou a quantidade de receptores GR no hipocampo ($t_{(10)}=2,37$; $p < 0,05$) e essa adaptação ocorreu diferentemente em ratos M quando comparados com os C. Também foi possível observar que a quantidade de receptores GR após o teste do LCE é diferente entre os grupos M e ME ($t_{(11)}=4,48$; $p < 0,05$). Os dados do presente estudo sugerem que animais desnutridos se expõem a mais situações de risco que ratos bem nutridos. Quando o enriquecimento ambiental foi realizado no período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso central observou-se um efeito de neuroproteção em relação às alterações produzidas pela desnutrição tanto na expressão de RNAm de receptores GR como no comportamento de avaliação de risco de ratos no LCE. Os dados do presente trabalho também mostraram que a desnutrição pode alterar a resposta de estresse mediada pelo eixo HPA após exposição ao teste do LCE, e que o enriquecimento ambiental possui efeito protetor em relação os efeitos da desnutrição precoce sobre a atividade deste eixo.

Palavras-chave: desnutrição precoce, enriquecimento ambiental, labirinto em cruz elevado, corticosterona, receptores GR e hipocampo.

Abstract

Rats subjected to protein malnutrition have high impulsivity and changes in risk-assessment behaviors in the elevated plus maze (EPM). Malnutrition can also influence the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA). Changes caused by malnutrition can be partly reversed by environmental stimulation; malnourished animals subjected to environmental enrichment had higher locomotion and exploration in the EPM compared with animals of the same condition and diet that were not stimulated. It was also demonstrated that stimulation can influence plasma corticosterone levels indicating a change in sensitivity of the HPA axis. This study aims to compare, in undernourished rats (M) and well nourished (C), the effects of environmental enrichment (E) in relation to plasma concentrations of corticosterone, expression of glucocorticoid receptors (GR) in the hippocampus and performance in EPM at 36 days of age. Male Wistar rats were divided into two groups according to diet and subdivided according handling environment. The environmental manipulation was performed within 8 to 35 days (1 hour per day). After testing in the EPM animals were decapitated and had their blood drawn and the brain removed. For the analysis of plasma corticosterone it was used the radioimmunoassay technique. For quantification of the glucocorticoid receptor (GR) in the hippocampus it was performed a quantitative analysis of gene expression by polymerase chain reaction (PCR) in real time. M rats showed lower body weight compared to C rats ($p < 0.001$). In relation to the EPM, M rats showed higher number of entries [$F_{(1,44)} = 9.01$, $p < 0.01$] and remain a higher percentage of time [$F_{(1,44)} = 9.08$, $p < 0.01$] in the open arms as compared to C. ME rats presented a percentage of time in the open arms ($6\% \pm 2\%$) similar to that of CN animals ($8\% \pm 2\%$). According to the real time PCR, the EPM test changed the quantity of GR receptors in the hippocampus ($t_{(10)} = 2.37$, $p < 0.05$), and that adaptation was different in M as compared with C rats. It was also observed that the amount of GR after EPM test was different between M and ME groups ($t_{(11)} = 4.48$, $p < 0.05$). Data from the present study suggest that M animals are more likely to explore risk situations than C rats. It is also suggested that environmental enrichment imposed during the critical period of central nervous system development may have neuroprotective effects in both physiological and behavioral changes produced by early protein malnutrition. The data of this work also showed that malnutrition may alter the stress response mediated by the HPA axis after exposure to the EPM test and that environmental enrichment has a protective effect against the effects of malnutrition on the functioning of that axis.

Key-words: neonatal malnutrition, environmental enrichment, elevated plus maze, corticosterone, GR receptors and hippocampus.

Lista de Abreviaturas

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico

BDNF: Fator Trófico Cerebral

C: Bem nutrido

CEnt: Bem nutrido, Estimulado, Não testado

CET: Bem nutrido, Estimulado, Testado

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CNnt: Bem nutrido, Não estimulado, Não testado

CNT: Bem nutrido, Não estimulado, Testado

CORT: Corticosterona Plasmática

CRH: Hormônio Liberador da Corticotrofina

E: Estimulados

EA1: Ambiente Enriquecido 1

EA2: Ambiente Enriquecido 2

GR: Receptor Glicocorticóide

HPA: Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

LAM: Labirinto Aquático de Morris

LCE: Labirinto em Cruz Elevado

M: Desnutrido

MEnt: Desnutrido, Estimulado, Não testado

MET: Desnutrido, Estimulado, Testado

MNnT: Desnutrido, Não estimulado, Não testado

MNT Desnutrido, Não estimulado, Testado

N: Não Estimulados

PCR: Análise semiquantitativa de expressão gênica através de reação da transcriptase reversa

SNC: Sistema Nervoso Central

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 A desnutrição proteica como modelo experimental de má nutrição e suas consequências no desenvolvimento do SNC	16
1.2 A desnutrição proteica e a resposta do organismo ao estresse	19
1.3 Efeitos da estimulação ambiental sobre as consequências da desnutrição proteica precoce.....	20
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo principal	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODO	27
3.1 Sujeito	27
3.1.1 Composição das ninhadas	27
3.1.2 Alojamento e Manutenção dos Animais	28
3.1.3 Composição dos Grupos	28
3.2 Equipamento	29
3.3 Estimulação e teste comportamental	31
3.4 Eutanásia	32
3.4.1 Corticosterona plasmática	33
3.4.2 Análise semiquantitativa de expressão gênica do receptor de Glicocorticóide no hipotálamo por meio de reação da transcriptase reversa em tempo real (Taqman [®] -PCR) ..	33
3.4.3 Imunofluorescência de receptores GR no hipocampo	35
3.5 Análise Estatística	36

4. RESULTADOS.....	38
4.1 Peso corporal	38
4.2 Comportamentos no LCE.....	40
4.3 Expressão de RNAm do receptor de GR no Hipocampo através de PCR em tempo real	43
4.4 Corticosterona Plasmática.....	45
4.3 Imunofluorescência de receptores GR no hipocampo	45
5. DISCUSSÃO.....	49
5.1 Peso Corporal	49
5.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)	50
5.3 Expressão de RNAm dos receptores de Glicocorticóides (GR) no hipocampo	53
5.4 Imunofluorescência de receptores GR no hipocampo.....	55
5.5 Corticosterona Plasmática	56
6. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. Introdução

Os últimos indicadores governamentais do Ministério da Saúde mostraram que a má nutrição infantil no Brasil diminuiu significativamente (Portal da Saúde, 2010). No entanto, a má nutrição ainda é um grande problema, pois mesmo com uma diminuição no percentual de crianças desnutridas no Brasil, ainda há uma alta incidência de má nutrição em regiões como o norte e o nordeste brasileiro (Portal da saúde, 2010). De acordo com o relatório da UNICEF, existem várias populações em diversas regiões do planeta que ainda sofrem com a má nutrição, juntamente com outras epidemias, como a malária, por exemplo (Unicef, 2006).

Estudos recentes têm mostrado que, a partir de 1980, houve um rápido declínio da prevalência de desnutrição em crianças, e concomitantemente houve uma elevação, em um ritmo mais acelerado, da prevalência de sobrepeso/obesidade em adultos (Batista Filho & Rissin, 2003). Entretanto, o ganho de peso da população adulta não significa que essa população passou a ter acesso a uma alimentação mais adequada e em proporções de nutrientes equilibrados. A atual alimentação do brasileiro tem se mostrado muito rica em gorduras e carboidratos e pobre em proteínas, ferro e vitaminas. Tal fato pode ser observado através do aumento na incidência de anemias e outras doenças ligadas à falta de nutrientes em populações com sobrepeso ou obesas (Batista Filho & Rissin, 2003; Tardido & Falcão, 2006).

Mesmo em uma dieta de alto valor calórico um desequilíbrio nutricional pode ser considerado como uma forma de má nutrição. A expressão “má nutrição” refere-se ao fato de que um ou mais nutrientes estão ausentes da dieta ou são oferecidos em uma quantidade inadequada (Morgane, Mokler, & Galler, 2002). A má nutrição é ainda considerada um problema mais grave quando afeta recém-nascidos ou crianças durante os estágios mais vulneráveis de seu desenvolvimento cerebral, compreendendo, nos seres humanos, o período desde o nascimento até os dois anos de idade (Morgane et al., 2002). Essa situação pode comprometer diversos eventos maturacionais, vindo a resultar em alterações morfológicas e neuroquímicas no SNC, além daquelas comportamentais e cognitivas (Levitsky & Barnes, 1972).

Entre os inúmeros modelos experimentais de estudo sobre a má nutrição o mais utilizado é o de restrição proteica, denominado de modelo de desnutrição proteica precoce. Esse modelo se refere à oferta de uma dieta com a quantidade total de proteína reduzida,

podendo esta ser imposta tanto no período pré-natal como no período pós-natal do indivíduo, ou mesmo em ambos os períodos.

1.1 A desnutrição proteica como modelo experimental de má nutrição e suas consequências no desenvolvimento do SNC.

A ingestão de proteína é fundamental para o desenvolvimento e manutenção do organismo, sendo que a sua falta pode resultar em consequências graves e até mesmo irreversíveis. As proteínas são agrupamentos de aminoácidos necessários para diversas funções do organismo, entre os quais se destacam os aminoácidos essenciais que são imprescindíveis para a constituição tecidual do corpo e, conseqüentemente, do sistema nervoso central (SNC) (Uauy & Dangour, 2006). Dessa maneira, o déficit de proteína, quando imposto no período crítico de amadurecimento do SNC, tem consequências muito graves sobre o desenvolvimento cerebral (Morgane et al., 2002).

Em alguns dos primeiros estudos que utilizaram o modelo de desnutrição proteica foi observado que neurônios e células da glia, na medula, apresentaram mudanças morfológicas que persistiram mesmo após vários meses de reabilitação nutricional, evidenciando os efeitos da desnutrição precoce (Winick, 1973). Winick, em um estudo prévio (1969), demonstrou que quanto mais cedo a desnutrição é imposta ao organismo mais permanentes serão os seus efeitos. Em outro estudo clássico, Dobbing e colaboradores constataram que a desnutrição precoce causou uma redução na densidade neuronal em regiões cerebrais como o hipocampo (Dobbing, 1975).

Mais recentemente outros estudos mostraram, de maneira mais específica, como a desnutrição proteica pode resultar em atrasos no desenvolvimento corporal e cerebral (Almeida, Tonkiss, & Galler, 1996; Cintra et al., 1997; Morgane et al., 2002; Santucci, Daud, Almeida, & de Oliveira, 1994), bem como em alterações bioquímicas e neurológicas (Feoli et al., 2006; Hermel et al., 2001), que por sua vez podem ocasionar alterações comportamentais (Barnes, 1976; De Oliveira & Almeida, 1985; Levitsky & Barnes, 1972; Riul, Carvalho, Almeida, Almeida, & Filosofia, 1999; Wainwright & Colombo, 2006).

Com relação às alterações neurológicas, a desnutrição proteica, quando imposta tanto no período pré-natal como pós-natal, pode causar uma alteração no processo de neurogênese e prejudicar o desenvolvimento hipocampal (Cintra et al., 1997; Kehoe, Mallinson, Bronzino, &

McCormick, 2001), causando um déficit no amadurecimento das células granulares e piramidais da região CA1 do hipocampo (Morgane et al., 2002), confirmando o que já havia sido relatado por Dobbing em 1971 e 1975.

Observou-se também que a desnutrição pode causar uma redução da ramificação dendrítica (Will, Galani, Kelche, & Rosenzweig, 2004), da mielinização de neurônios na região CA3 do hipocampo (Garcia-ruiz, Diaz-cintra, Cintra, & Corkidi, 1993) e do número de espinas sinápticas em diversas regiões subcorticais (Durán, Galler, Cintra, & Tonkiss, 2006a). A desnutrição proteica, através do prejuízo no desenvolvimento dos oligodendrócitos, pode prejudicar a gliogênese tardia, resultando em um prejuízo no crescimento cerebral do organismo (Morgane et al., 2002).

Em relação aos neurotransmissores, foi demonstrado que a desnutrição pode causar uma diminuição na produção e na quantidade de receptores de noradrenalina, influenciando diretamente a sua recaptação na fenda sináptica (Almeida et al., 1996; Morgane et al., 1993). Já com relação ao mecanismo dopaminérgico, foi demonstrado que a desnutrição pode reduzir a quantidade de receptores no córtex e no cerebelo (Almeida et al., 1996; Mokler, Bronzino, Galler, & Morgane, 1999; Morgane et al., 1993). Relatou-se também que a desnutrição causa uma redução nos níveis totais do glutamato no cérebro (Cintra et al., 1997; Luebke, John, & Galler, 2000; Mokler, Galler, & Morgane, 2003; Morgane et al., 1993; Morgane et al., 2002). Almeida e colaboradores (1996) relataram que a desnutrição, quando imposta no período pré-natal, alterou a quantidade e a sensibilidade de receptores benzodiazepínicos.

Ainda com relação às consequências da desnutrição precoce sobre os sistemas de neurotransmissão, especialmente em relação ao sistema serotoninérgico, demonstrou-se que ratos desnutridos, e que tiveram estimulação elétrica dos núcleos da rafe, apresentaram uma liberação aumentada de serotonina em comparação com os ratos bem nutridos (Mokler et al., 1999; Mokler et al., 2003; Morgane et al., 1993). Tal alteração da quantidade de serotonina, causada pela desnutrição precoce, pode vir a resultar em uma má formação hipocampal, observado através de inibição da atividade no hipocampo. Tal fato resulta em uma atividade alterada de insumos extra-hipocampais, como entradas serotoninérgicas para interneurônios, o que pode vir a alterar a resposta neuroquímica da ansiedade (Almeida et al., 1996; Mokler et al., 2003; Morgane et al., 2002).

Além de alterações morfológicas e bioquímicas, a desnutrição proteica pode também proporcionar alterações comportamentais em relação à atividade exploratória de ratos em modelos como o labirinto em cruz elevado (LCE) (De Oliveira & Almeida, 1985; Valadares,

Fukuda, Françolin-Silva, Hernandez, & Almeida, 2010). Estudos mostraram que ratos submetidos à desnutrição proteica precoce, ao serem expostos ao LCE, apresentaram maior número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do aparato em comparação a ratos bem nutridos (Almeida, Garcia, & de Oliveira, 1993; Françolin-Silva, da Silva Hernandez, Fukuda, Valadares, & Almeida, 2006; Soares et al 2012). Também foi observado no LCE que ratos submetidos à desnutrição proteica apresentaram diferentes comportamentos de avaliação de risco: como mergulhos, esticamentos e levantamentos quando comparados com ratos bem nutridos (Bertoglio & Carobrez, 2000; Cruz, Frei, & Graeff, 1994; Hernandez & Almeida, 2003).

Tais alterações comportamentais indicam que a desnutrição proteica precoce pode prejudicar a resposta de ansiedade de ratos, como já mencionado anteriormente (Almeida et al., 1993; Bertoglio & Carobrez, 2000; Françolin-Silva et al., 2006). A resposta de ansiedade alterada do rato desnutrido pode ser observada através de uma maior impulsividade do rato no aparato. Esta maior impulsividade é caracterizada por visitas mais frequentes a lugares abertos e desprotegidos como os braços abertos do LCE, apresentando pouco ou nenhum comportamento de avaliação de risco (Almeida et al., 1993; Cabral & Almeida, 2008; Françolin-Silva et al., 2006). A alteração no comportamento de avaliação de risco e da resposta de ansiedade (Almeida et al., 1993; Françolin-Silva et al., 2006; Soares et al 2012) mostra que a desnutrição pode influenciar a maturação de estruturas pertencentes ao sistema límbico, estruturas que são responsáveis pela mediação da resposta de ansiedade (Bertoglio, Anzini, Lino-de-Oliveira, & Carobrez, 2005; Gray, 1978; McNaughton & Gray, 2000).

Outro modelo animal que também pode ser utilizado para o entendimento das consequências da desnutrição precoce é o Labirinto Aquático de Morris (LAM) (Morris, 1981). De modo geral, o LAM é utilizado para a compreensão de aspectos relacionados à memória espacial de ratos (Valadares et al., 2010; Xavier & Costa, 2009), bem como aspectos relacionados à aprendizagem (Fukuda, Françolin-Silva, & Almeida, 2002). Em um dos primeiros estudos utilizando esse modelo com ratos, que foram desnutridos durante o período pré-natal, observou-se que esses animais apresentaram um déficit somente no teste de navegação com pistas distais (Córdoba, Arolfo, Brioni, & Orsingher, 1994). Posteriormente foi demonstrado, em outro estudo, (Fukuda, Françolin-Silva, Hernandez, Valadares, & Almeida, 2007), que ratos desnutridos apenas no período pós-natal apresentam latências maiores de aprendizagem em relação a ratos bem nutridos. Este resultado mostra que o rato

desnutrido pode aprender a tarefa tanto quanto o rato bem nutrido, no entanto, o desnutrido necessita de um maior número de tentativas para encontrar a plataforma submersa.

1.2 A desnutrição proteica e a resposta do organismo ao estresse

Durante a gestação, e logo após o nascimento, o cérebro é mais sensível a estímulos ambientais (Ansari, 2008; Cancedda et al., 2004; Mabandla et al., 2007). Em ratos o desenvolvimento do sistema nervoso central é mais evidente entre os 7º e 14º dias de vida pós-natal, perdurando até os 35 dias de vida (Morgane et al., 2002). Durante esse período de desenvolvimento, estão ocorrendo fenômenos como neurogênese, glicogênese e mielinização em diferentes regiões do cérebro (Chapillon, Patin, Roy, Vincent, & Caston, 2002; Levitsky & Barnes, 1972; Morgane et al., 2002). A sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) também é influenciada pela experiência individual, principalmente a experiência adquirida no período crítico neonatal de amadurecimento do SNC (Fenoglio, Chen, & Baram, 2006), tal experiência pode ocasionar uma interferência na resposta do organismo ao estresse (Ayala, 2002). Dessa maneira, a imposição de uma dieta pobre em proteína no início da vida de um organismo poderia resultar em uma alteração na sensibilidade do eixo HPA e consequentemente modificar a resposta de estresse mediada por esse eixo.

A modificação da resposta ao estresse, causada pela desnutrição proteica, foi demonstrada pela alteração dos níveis de corticosterona observada em ratos desnutridos, sugerindo que a desnutrição precoce modifica a resposta adrenocortical ao estresse (Adlard & Smart, 1972; Sampaio et al., 2008) e o funcionamento do eixo HPA (Durán, Galler, Cintra, & Tonkiss, 2006b; Graeff, 2003; Juruena, Cleare, & Pariante, 2004; Kehoe et al., 2001; Meijer et al., 2005; Sampaio et al., 2008). Dessa maneira, a desnutrição proteica, imposta desde o início da vida, poderia estar agindo como agente de estresse crônico (Durán et al., 2006b; Kehoe et al., 2001), o que poderia levar a uma diminuição da expressão do receptor de serotonina 5-HT1A, resultando em um prejuízo do processo de neurogênese no SNC, mais especificamente em estruturas do sistema límbico, podendo causar uma alteração na resposta de ansiedade, conforme já mencionado anteriormente.

É importante destacar que os Glicocorticóides circulantes, como a corticosterona plasmática, são geralmente catabólicos e agem inibindo a divisão celular, a síntese proteica, a captação de aminoácidos e glicose pelos tecidos (Lister et al., 2005; Liu, 1997; Mesquita,

Pereira, & Andrade, 2002). No SNC a elevação sustentada de corticosterona mediada pelo estresse pode contribuir para a atrofia hipocampal, mas não é suficiente para causar morte neuronal (Kehoe et al., 2001; Mesquita et al., 2002).

No sistema nervoso central os Glicocorticóides são hormônios moduladores potentes para as funções neurais (Meijer et al., 2005), possuindo receptores específicos no hipocampo, sendo eles: receptores Glicocorticóides (GRs), os quais estão presentes no hipocampo, hipotálamo e na hipófise; e mineralocorticóides, presentes no hipocampo (Jurueña et al., 2004). Os GRs têm como função regular, por meio do *feedback* negativo, os níveis de Glicocorticóides circulantes (Kloet, Vreugdenhil, Oitzl & Joëls, 1998). Acredita-se que os GRs sejam mais importantes na regulação da resposta ao estresse quando os níveis de Glicocorticóides circulantes estão altos

Alguns autores discutem que a desnutrição proteica pós-natal pode acarretar em uma diminuição do número de GRs no cérebro, mais especificamente no hipotálamo, com consequentes alterações na regulação da retroalimentação negativa da corticosterona sobre o HPA (Adlard & Smart, 1972; Sampaio et al., 2008). Acredita-se também que a desnutrição pode induzir a elevação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e da corticosterona circulante (Kehoe et al., 2001), bem como ocasionar uma diminuição dos níveis de fator trófico cerebral (BDNF) (Mesquita et al., 2002), resultando em uma modificação dos níveis do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular hipotalâmico (Ayala, 2002; Palma, Tiba, Machado, Tufik, & Suchecki, 2007; Van Pett et al., 2000).

1.3 Efeitos da estimulação ambiental sobre as consequências da desnutrição proteica precoce

Os prejuízos causados pela desnutrição não são completamente recuperados através da reabilitação nutricional (Almeida et al., 1993; Riul et al., 1999). Entretanto, acredita-se que muitos desses efeitos podem ser amenizados ou revertidos pela estimulação ambiental e tátil (Gomes, Frantz, Sanvitto, Anselmo-Franci, & Lucion, 1999; Levitsky & Barnes, 1972; Riul et al., 1999).

De acordo com Meaney e Aitken (1985), a estimulação pós-natal pode ter um efeito mais eficaz até os 14 primeiros dias após o nascimento, período considerado como crítico para o desenvolvimento pós-natal do SNC. Como já dito anteriormente, é nessa primeira semana

que estão ocorrendo diversos eventos maturacionais no SNC, as experiências ambientais, como a estimulação tátil (*handling*) e o enriquecimento ambiental, por exemplo, podem alterar a sensibilidade e a atividade de estruturas e vias cerebrais (Gomes et al., 1999; Jutapakdeegul, Casalotti, Govitrapong, & Kotchabhakdi, 2003).

Foi demonstrado que a estimulação ambiental pós-natal pode proporcionar diminuição dos níveis de ACTH, rápido retorno aos níveis basais das concentrações plasmáticas da corticosterona e redução dos níveis de CRF no hipotálamo (Levine, 2001; Meaney, 2001; Pryce & Feldon, 2003). Foi observado também que a estimulação ambiental induz o aumento na densidade dos receptores Glicocorticóides no hipocampo, interferindo diretamente no *feedback* negativo (Gomes et al., 1999; Liu, Schaffner, Chang, Vaszil, & Barker, 1997; Smythe, Rowe, & Meaney, 1994; Wigger & Neumann, 1999), o que resulta em uma alteração na atividade do eixo HPA.

Com relação à estimulação tátil, um estudo mostrou que ratos que foram expostos ao *handling*, uma forma de estimulação tátil, e que também foram mantidos com dieta comercial, apresentaram algumas alterações bioquímicas, como: aumento dos níveis do hormônio de crescimento e alteração nos níveis de ornitina descarboxilase (Schanberg & Field, 1987). Em outro estudo foi demonstrado que animais expostos ao ambiente enriquecido, um modelo bastante utilizado para a estimulação ambiental, apresentaram menores níveis de corticosterona plasmática quando comparados com animais que não foram submetidos a essa manipulação ambiental após serem submetidos ao teste de interação social (Morley-Fletcher et al., 2003). Dessa forma, a estimulação, seja ambiental ou tátil, pode desempenhar um papel importante na plasticidade cerebral, possibilitando que o sujeito apresente melhoria de desempenho em modelos animais de comportamento (Artola et al., 2006; Cancedda et al., 2004).

Como já mencionado anteriormente, o enriquecimento ambiental é um dos principais modelos utilizados para estimulação ambiental. Foi criado a partir de uma adaptação de um labirinto feito por Hebb em 1947 (Van Praag, Kempermann, & Gage, 2000). Esse tipo de modelo de estimulação refere-se a uma adaptação da condição ambiental, diferentemente da condição ambiental padrão, que pode proporcionar uma melhora no desenvolvimento do organismo através de uma estimulação física e social (Van Praag et al., 2000).

No início de 1960, o grupo de Rosenzweig realizou uma série de estudos que visavam explorar os efeitos de um ambiente enriquecido no desenvolvimento do cérebro e nas habilidades cognitivas. Krech, Rosenzweig e Bennett (1960) mostraram que roedores

expostos ao ambiente enriquecido podem ter algumas estruturas e funções do encéfalo alteradas. Muitos outros trabalhos mostraram que o córtex cerebral de animais expostos ao ambiente enriquecido apresentou uma maior espessura, principalmente no córtex occipital, em comparação com animais que vivem em condições padrão de laboratório (Diamond, Krech, & Rosenzweig, 1964; Rosenzweig & Bennett, 1996; Rosenzweig, Love, & Bennett, 1968). Uma das razões para a maior espessura do córtex pode ser o aumento do tamanho dos neurônios, o número e o comprimento dos dendritos e o aumento de espinhas dendríticas, proporcionados pela exposição contínua ao ambiente enriquecido (Diamond et al., 1964; Will et al., 2004). Também foi observado que a estimulação ambiental, por meio do enriquecimento ambiental, possibilitou a recuperação de danos causados no hipocampo em animais que foram submetidos à hipóxia-isquêmica (Pereira et al., 2007; Rodrigues et al., 2004).

De acordo com Phan e colaboradores (1997), os efeitos causados pelo enriquecimento ambiental podem persistir durante a maturidade, efeito este observado pela diminuição de perda de neurônios no hipocampo, aumento dos níveis de corticosterona plasmática e diminuição dos receptores glutamatérgicos (Salpolsky et al., 1985). Logo, esses dados sugerem que a estimulação pós-natal pode prevenir a perda neuronal associada à idade (Pham, Söderström, Winblad, & Mohammed, 1999). A estimulação ambiental, conforme já mencionado anteriormente, pode desempenhar também um importante papel na plasticidade cerebral (Artola et al., 2006; Cancedda et al., 2004), possibilitando que o sujeito apresente melhoria na aprendizagem, mostrando que a estimulação ambiental pode ter efeito sobre o comportamento.

Em relação aos efeitos comportamentais do enriquecimento ambiental, ratos expostos ao LCE e submetidos ao ambiente enriquecido apresentaram um aumento do comportamento exploratório (Levitsky & Barnes, 1972) e do tempo de exploração dos braços abertos (Fernández-Teruel, Escorihuela, Jimenez, & Tobella, 1990; Fernández-Teruel, Escorihuela, Castellano, González, & Tobeña, 1997; McIntosh, Anisman, & Merali, 1999). Também foi demonstrado que ratos submetidos à desnutrição proteica e expostos a 1 hora de enriquecimento ambiental apresentaram número de entradas e tempo gasto nos braços abertos semelhantes a ratos bem nutridos e que não passaram pela estimulação ambiental (Soares et al., 2012).

Na literatura não existem dados que correlacionem a desnutrição proteica à estimulação ambiental através de medidas de corticosterona plasmática e expressão de receptores Glicocorticóides no hipocampo (que estão relacionadas diretamente com o

funcionamento do eixo HPA), após a exposição ao LCE. Devido ao avanço da compreensão sobre os mecanismos de estresse, é de grande importância o entendimento do funcionamento do eixo HPA referente aos efeitos da desnutrição proteica e de como o enriquecimento ambiental pode atenuar os efeitos deletérios da desnutrição em ratos durante o período crítico do desenvolvimento neonatal do SNC.

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal

- Comparar os efeitos da desnutrição proteica e do enriquecimento ambiental sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos expostos ou não ao labirinto em cruz elevado.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos da desnutrição proteica e do enriquecimento ambiental sobre a expressão de RNAm do receptor de Glicocorticóide no hipocampo.
- Investigar os efeitos da desnutrição proteica e do enriquecimento ambiental sobre a expressão proteica do receptor de Glicocorticóide no hipocampo.
- Investigar os efeitos da desnutrição proteica e do enriquecimento ambiental sobre os níveis de corticosterona plasmática em condições basais.
- Investigar os efeitos da desnutrição proteica e do enriquecimento ambiental sobre o desempenho no labirinto em cruz elevado aos 36 dias de vida.

MATERIAL E MÉTODO

3. Material e Método

3.1 Sujeito

No presente trabalho, foram utilizadas 16 ninhadas de ratos albinos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Permaneceram alojadas no biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento do Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*. A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do campus da USP de Ribeirão Preto (processo nº: 09.1.516.53.8).

3.1.1 Composição das ninhadas

As ninhadas foram recebidas no laboratório no dia de seu nascimento (dia 0), sendo que, nesse dia, foi formada a ninhada composta pela rata-mãe, 6 filhotes machos e 2 fêmeas. Os filhotes foram separados por sexo e divididos aleatoriamente nas ninhadas a fim de se evitar que, na formação das mesmas, fossem agrupados somente filhotes provenientes de uma mesma rata-mãe. Do dia do nascimento aos 21 dias de idade (fase de lactação), os filhotes foram mantidos juntamente com suas mães. Os pesos das ratas-mães e das respectivas ninhadas foram registrados no dia 0 (dia de nascimento dos filhotes) e aos 7, 14 e 21 dias de vida dos filhotes. Após o desmame (dia 21), os filhotes foram pesados individualmente aos 28 e 35 dias de idade. Durante todo o período anterior à gestação e durante a gestação, as ratas-mães foram tratadas, no Biotério Central do Campus, com dieta comercial balanceada (Nuvilab®) e água *ad libitum*.

3.1.2 Alojamento e Manutenção dos Animais

Durante a fase de lactação (0 a 21 dias), as ninhadas foram alojadas em caixas de polipropileno (41x34x18 cm), forradas com raspas de madeira (maravalhas), com tampa gradeada de aço inoxidável, comedouro e bebedouro de vidro. As maravalhas foram trocadas três vezes por semana. A comida e a água foram trocadas diariamente. Aos 21 dias foi realizado o desmame que consiste na separação dos filhotes das ratas-mães (descartadas a partir dessa data, juntamente com os filhotes fêmeas). A partir do dia 21, os filhotes machos foram mantidos individualmente em caixas-viveiro de polipropileno (30x19x18 cm) nas mesmas condições (de alimentação e troca de maravalhas) do período de lactação.

3.1.3 Composição dos Grupos

No dia 0 os animais foram randomicamente divididos em dois grandes grupos: Bem nutridos (dieta contendo 16% de proteína) e Desnutridos (Dieta contendo 6% de proteína). As dietas foram preparadas com a proporção de nutrientes de acordo com o recomendado pela AIN (American Institute of Nutrition) e AOAC (Association of Official Agriculture Chemists) com a adição de metionina e colina, conforme a descrição de Cambraia e colaboradores (1997).

As dietas eram isocalóricas e continham a seguinte composição para os desnutridos: Proteína - 6%; carboidrato (maisena) – 79,8%; lipídeos (óleo de milho) - 8%; mistura salina - 5%; mistura de vitamina 1%; colina 0,2%; além de metionina (2 g por quilo total de caseína); e a seguinte composição para os bem nutridos: Proteína - 16%; carboidrato (maisena) – 69,8%; lipídeos (óleo de milho) - 8%, mistura salina - 5%; mistura de vitamina 1%; colina 0,2%; além de metionina (2 g por quilo total de caseína).

Durante o período de lactação, foi fornecida para as ratas-mães, a dieta contendo 6% ou a contendo 16% de proteína. Na pós-lactação, os ratos continuaram sendo mantidos com a dieta de 6% ou com a de 16% de proteína, até os 36 dias de vida.

Os animais de ambas as condições de dieta foram submetidos ou não à estimulação ambiental pós-natal, sendo consequentemente subdivididos em outros dois grupos: estimulados (E) e não estimulados (N). Para analisar os efeitos da estimulação, algumas

ninhadas foram expostas ao ambiente enriquecido durante o período de 8 a 35 dias de idade (Tabela 1).

Apenas metade dos animais, de cada condição de dieta e estimulação, foram expostos apenas uma única vez ao teste do labirinto em cruz elevado enquanto que a outra metade não foi exposta ao mesmo. Os grupos não testados foram compostos por 16 sujeitos, sendo que 10 ratos foram utilizados para realização de PCR em tempo real e corticosterona plasmática, e os outros 6 (apenas os pertencentes aos grupos que não foram testados) foram perfundidos com paraformaldeído a 4% para a obtenção das amostras teciduais necessárias para a análise por imunofluorescência. Já com relação aos grupos testados, foram utilizados 12 animais, sendo 10 para realização de PCR em tempo real e corticosterona plasmática. Dessa maneira, foram utilizados para o presente estudo um total de 104 ratos (Tabela 1).

Tabela 1: divisão dos grupos de acordo com a estimulação e teste. (N) ratos não estimulados, (E) estimulados. (nT) ratos não testados, (T) ratos testados.

	ESTIMULAÇÃO	TESTE NO LCE	GRUPOS
Bem nutridos (C)	N	nT	CNnT
	N	T	CNT
	E	nT	CEnT
	E	T	CET
Desnutridos (M)	N	nT	MNnT
	N	T	MNT
	E	nT	MEEnT
	E	T	MET

3.2 Equipamento

O Ambiente Enriquecido 1 (EA1) foi montado em uma gaiola medindo 40x25x20 cm, com 3 lados em acrílico transparente e a parede da frente em aço inoxidável com piso de aço para colocação de maravalhas. Nessas gaiolas foram colocados objetos, como: rodas de atividade, túneis, brinquedos de plástico (com formatos e texturas diferentes), bolinhas de gude, objetos que emitem sons (como chocalhos), espelhos e pedaços de madeira.

Semanalmente todos esses objetos eram trocados a fim de garantir o efeito novidade como descrito em Diamond (2001) e Pereira et al (2007) (Figura 1).

O Ambiente Enriquecido 2 (EA2) consistiu em uma gaiola de medidas 40x60x90 cm, com três pavimentos interligados por rampas e um túnel, contendo: uma roda de atividade, túneis, espelhos nas paredes laterais e diversos outros objetos (brinquedos de plástico, bolas de borracha, objetos de madeira) com formas, texturas e cores diferentes, e ainda objetos que ao serem tocados pelos animais emitem sons. Como no EA1, os objetos utilizados dentro da gaiola eram trocados semanalmente (Figura 1).

Figura 1: (A) EA1, utilizado do 8º ao 21º dia de vida. (B) EA2, utilizado do 22º ao 35º dia de vida

Foi também utilizado o labirinto em cruz elevado (LCE), que consiste em um equipamento de madeira, elevado a uma altura de 50 cm do solo, constituído de dois braços abertos (50x10 cm) com uma borda de acrílico de 1,0 cm, dois braços fechados com as paredes de madeira (50x10x40cm), unidos ortogonalmente a uma plataforma central (10x10cm) (Figura 2).

Figura 2: Labirinto em cruz elevado

3.3 Estimulação e teste comportamental

A metade do total de animais foi exposta ao ambiente enriquecido, sendo que, para tal, foram realizados dois procedimentos de estimulação. O primeiro procedimento de estimulação foi realizado durante o período de lactação, do 8º ao 21º dia, com as ninhadas de bem nutridos e desnutridos, no EA1. Para tal, os filhotes foram separados de suas mães durante 1 hora por dia e colocados em uma gaiola devidamente preparada, como já descrita anteriormente, seguindo o protocolo experimental como estabelecido por Soares e colaboradores (2012).

Do 22º ao 35º dia (período de pós-lactação), ratos de ambas as condições nutricionais foram submetidos ao EA2, durante 1 hora por dia. Nesse procedimento de estimulação, ratos bem nutridos e desnutridos foram colocados simultaneamente na gaiola, para livre exploração (entre 10 e 12 animais por sessão), a fim de garantir uma mesma estimulação ambiental, conforme o protocolo experimental estabelecido por Soares e colaboradores (2012).

Os grupos não expostos ao ambiente enriquecido, durante o período de 8 a 21 dias, foram mantidos em sua gaiola de lactação, mas separados de suas mães durante o mesmo período de manipulação dos grupos estimulados.

No 36º dia, foi realizado o teste no labirinto em cruz elevado (LCE). As sessões experimentais foram gravadas por uma videocâmera montada verticalmente sobre o LCE e depois analisadas, foi utilizado o software X-Plo-Rat, 2005, versão 1.1.0, desenvolvido pelo Laboratório de Comportamento Exploratório da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP), em <http://scotty.ffclrp.usp.br>.

Foram analisados os seguintes comportamentos convencionais: frequência de entradas nos braços abertos e fechados (entrada no braço, definida pela colocação das quatro patas dentro do braço), tempo de permanência em ambos os braços e no centro, além de suas respectivas porcentagens; também foram analisados outros comportamentos, como: exploração vertical (rearing); mergulhos protegidos (quando realizados nos braços fechados e no centro) e desprotegidos (quando realizados nos braços abertos), considerando-se mergulho quando o animal se apoia nas patas traseiras e inclina a cabeça para fora do braço aberto em direção ao piso da sala onde está instalado o labirinto; esticamentos protegidos (quando realizados nos braços fechados e no centro) e desprotegidos (quando realizados nos braços abertos), considerando-se esticamento quando o animal mantém as patas traseiras imóveis e estica o corpo para a frente, seguido da volta para a mesma posição (Cruz et al., 1994).

Os animais pertencentes aos grupos CNnT, CEnT, MNnT e MEnT não foram submetidos ao teste do LCE.

Figura 3: Modelo esquemático do procedimento de tratamento dos animais, estimulação, teste comportamental e sacrifício.

3.4 Eutanásia

Após 60 minutos das sessões de teste no LCE, entre as 08h00min e 10h00min, 40 ratos (10 por grupo) pertencentes aos grupos CNT, CET, MNT e MET foram decapitados e tiveram os cérebros removidos em condições livres de RNase, e o sangue foi coletado para as dosagens bioquímicas. Outros 40 ratos (10 por grupo) que não foram expostos ao LCE (CNnT, CEnT, MNnT e MEnT) foram decapitados entre 08h00min e 10h00min, seguindo o mesmo procedimento já descrito anteriormente.

No 36º dia de vida, 24 animais (6 por grupo) pertencentes aos grupos CNnT, CEnT, MNnT e MEnT foram anestesiados com quetamina (22 mg/Kg; i.p.) e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina 0,9%, seguida de solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4).

3.4.1 Corticosterona plasmática

As dosagens de corticosterona plasmática foram realizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profa. Dra. Lucila LeicoKagohara Elias. Os métodos para a dosagem em radioimunoensaio foram utilizados, segundo os protocolos rotineiros, de acordo com o método descrito por Elias e colaboradores (1997 e 2004).

Foi utilizado um anticorpo Anticorticosterona (Sigma), preparado em coelhos, com o hormônio conjugado com albumina bovina. A corticosterona [1,2-3(H)] (New England Nuclear) foi utilizada como hormônio marcado. Na separação da fração livre ligada foi utilizada uma solução de carvão-dextran 0,5/0,05%.

3.4.2 Análise semiquantitativa de expressão gênica do receptor de Glicocorticóide no hipotálamo por meio de reação da transcriptase reversa em tempo real (Taqman®-PCR).

A quantificação do RNAm de receptores de GR foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profa. Dra. Lucila LeicoKagohara Elias.

Os cérebros foram removidos em condições RNasefree e em seguida estocados no freezer a -80°C até a etapa de microdissecção do hipocampo. As amostras de tecidos foram obtidas por “punch” (microdissecção) de secções coronais de 1500 µm, segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1997): -2,3 mm até -3,8 mm, em relação ao Bregma. O tecido foi coletado por meio de uma agulha de 2 mm de diâmetro. O RNA total

dessas amostras foi extraído utilizando-se TRIzol® Reagent (Invitrogen). A integridade do RNA (não degradado) extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml), preparado com tampão TBE 1X. Foram utilizadas apenas as amostras de RNA íntegras, apresentando duas bandas visíveis, correspondentes ao RNA 18S e 28S. O RNA total foi quantificado por meio de espectrofotômetro (Gene Quant II, Pharmacia Biotech).

Após a etapa acima descrita, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir de 250 ng de RNA, por kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). O cDNA obtido foi utilizado para as reações da PCR em tempo real. Sondas e iniciadores do gene dos neuropeptídeos NPY e AgRP marcados com repórter fluorescente 6-carboxi-4,7,2',7'-tetraclorofluoresceína (TET) foram utilizados. As reações foram realizadas em volumes de 12 µl (4 µl de cDNA), utilizando reagentes TaqMan EZ RT-PCR (Perkin Elmer, Foster City, CA cat# N808-0235), seguindo as orientações do fabricante, reações com 40 ciclos foram realizadas em um instrumento ABI PRISM 7000 (Catálogo 4330087, Perkin Elmer, Foster City, CA). A β -actina foi utilizada como gene de referência (controle endógeno) da reação. A expressão do gene foi considerada para amostras que apresentarem intensidades de fluorescência acima de dois desvios padrão da média das intensidades dos controles negativos (com ausência de RNA). A expressão do gene-alvo foi normalizada utilizando-se o controle endógeno e calculada pela comparação com o calibrador (grupo controle dos protocolos experimentais). Dessa forma, o resultado obtido representará a expressão relativa de RNAm do gene de interesse.

Um gene *housekeeping* foi utilizado para normalizar os resultados: β -actina. A expressão relativa do gene-alvo foi calculada baseando-se no *threshold cycle* (Ct). Os resultados foram analisados de acordo com o método $\Delta\Delta Ct$. A média geométrica do Ct do gene de referência (β -actina) foi subtraída do Ct do gene de interesse para determinar o ΔCt de cada amostra. O ΔCt do calibrador (grupo controle) foi subtraído do ΔCt de cada amostra para determinar o $\Delta\Delta Ct$. Esse valor foi utilizado na equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, cujo resultado representará a expressão relativa de RNAm expressa em unidades arbitrárias.

3.4.3 Imunofluorescência de receptores GR no hipocampo

A análise de imunofluorescência, para marcação de receptores Glicocorticóides (GR) no hipocampo, foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profa. Dra. Lucila LeicoKagohara Elias, utilizando os protocolos previamente estabelecidos nesse laboratório.

Seis animais de cada grupo (CNnT, CEnT, MNnT e MEnT) foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca. Após a perfusão, os encéfalos foram coletados e armazenados em paraformaldeído 4%, durante 4 horas. Após, o material foi transferido para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 durante 48 horas, quando foram congelados em isopentana por 30 segundos, sendo armazenados em freezer -70°C. Os tecidos cerebrais (hipocampo) foram seccionados em cortes de 30µm de espessura utilizando-se um criostato. As regiões do hipocampo desejadas foram coletadas em triplicatas e armazenadas em solução crioprotetora (20% de glicerol, 30% de etilenoglicol, 50% de PBS) a -20°C. A realização da imunoistoquímica teve início com o bloqueio da peroxidase endógena com solução H₂O₂ (0,3%), seguido do bloqueio das ligações inespecíficas utilizando-se soro normal da espécie apropriada. Posteriormente, para visualização da expressão de GR, os cortes foram incubados em temperatura ambiente por 18-20 horas com o anticorpo primário rabbit anti-p-STAT3 (1:1,000; CellSignaling Technology) e a seguir incubados com o segundo anticorpo biotilado anti-rabbit (1:1,000; Vector Laboratories) por um período de 1 hora. Para a coloração, foi utilizado o método de avidina-biotina-peroxidase (Vector), cuja reação confere ao núcleo das células neuronais uma coloração de violeta escuro a preto.

No protocolo de co-localização, o protocolo básico de imunoistoquímica foi seguido. No segundo dia, após o término do protocolo descrito acima, foi utilizado anticorpo anti-p-STAT3 (1:500; CellSignaling Technology) e o anticorpo secundário será CY5 donkey anti-mouse (1:500; Jackson Laboratory) para a imunofluorescência qualitativa. As fotomicrografias foram capturadas com um microscópio Leica 200 DC equipado com uma câmera digital, ligado a um dispositivo de aumento de contraste. As células imuno-reativas positivas de duas secções por rato foram estimadas por contagem de coloração negra a partir de uma área constante usando o software Image J (versão 1,38; National Institutes of Health).

Todo o procedimento de coleta dos tecidos e análise foi realizado conforme os protocolos experimentais já estabelecidos do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.5 Análise Estatística

Os dados de peso corporal das mães e dos filhotes e as medidas bioquímicas e comportamentais foram inicialmente avaliados quanto à normalidade de sua distribuição utilizando o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados, que apresentaram uma distribuição normal, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para comparar efeitos de dieta (bem nutridos x desnutridos), efeitos de estimulação, níveis de corticosterona plasmática e dados comportamentais. Em relação à expressão gênica obtida através do PCR em tempo real, foi utilizado o teste *t de Student* a fim de se comparar o efeito do grupo bem nutrido em relação aos grupos experimentais. Quando pertinente, foi feito teste de comparações múltiplas (*Newman-Keuls*), sempre considerando como significativo um valor de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Peso corporal

Em relação aos pesos corporais das ratas-mães, a ANOVA mostrou diferença em relação aos fatores dieta [$F_{(1,19)} = 7,37$; $p < 0,05$], dia [$F_{(3,57)} = 118$; $p < 0,001$] e interação dieta e dia [$F_{(1,57)} = 23,63$; $p < 0,001$]. No entanto, não foram observadas diferenças em relação ao fator estimulação, e em relação às interações dos fatores dieta e estimulação, estimulação e dia e dieta, estimulação e dia (Figura 4).

Figura 4: Peso das ratas-mães nos dias 0, 7, 14 e 21 de idade das respectivas ninhadas. * $p < 0,001$ se refere à comparação entre os grupos desnutrido e bem nutrido no 14º dia, ** $p < 0,001$ se refere à comparação entre os grupos desnutrido e bem nutrido no 21º dia. CN = Bem nutrido não-estimulado; CE = Bem nutrido estimulado; MN = desnutrido não-estimulado; ME = desnutrido estimulado.

Em relação ao peso corporal das ninhadas a análise estatística mostrou que há diferenças em relação aos fatores dieta [$F_{(1,18)} = 682,37$; $p < 0,001$], estimulação [$F_{(1,18)} = 10,95$; $p < 0,01$] e dia [$F_{(3,54)} = 1862,77$; $p < 0,001$]. A análise também mostrou diferenças nas interações entre os fatores dieta e estimulação [$F_{(1,18)} = 7,74$; $p < 0,05$], dieta e dia [$F_{(3,54)} = 842,11$; $p < 0,001$], estimulação e dia [$F_{(3,54)} = 2,86$; $p < 0,05$] e dieta, estimulação e dia [$F_{(3,54)} = 7,68$; $p < 0,01$] (Figura 5).

Em relação aos pesos individuais houve diferenças nos fatores dieta [$F_{(1,139)} = 1244,08$; $p < 0,001$], estimulação [$F_{(1,139)} = 189,4$; $p < 0,001$] e dia [$F_{(1,139)} = 154,73$; $p < 0,001$]. Entretanto, não houve interação entre os fatores dieta e estimulação, dieta e dia, estimulação e dia, dieta, estimulação e dia (Figura 5).

Figura 5: (A) Médias de peso das ninhadas nos dias 0, 7, 14 e 21, * $p < 0,001$: grupo desnutrido comparado com grupo bem nutrido do dia 7; ** $p < 0,001$: grupo desnutrido compara com grupo bem nutrido do dia 14; *** $p < 0,001$: grupo desnutrido compara com grupo bem nutrido do dia 21. # $p < 0,001$: dia 0 comparado com os demais dias. (B) media do peso corporal individual dos ratos aos 28 e 35 dias de vida. * $p < 0,001$: grupo desnutrido comparado ao grupo bem nutrido no dia 28, ** $p < 0,001$ comparado ao grupo bem nutrido no 35º dia; # $p < 0,001$: dia 28 comparado com o dia 35. CN = Bem nutrido não-estimulado; CE = Bem nutrido estimulado; MN = desnutrido não-estimulado; ME = desnutrido estimulado.

4.2 Comportamentos no LCE

Com relação ao número de entradas nos braços fechados (EBF), a ANOVA não mostrou qualquer diferença significativa em relação aos fatores dieta e estimulação (Figura 6).

Figura 6: Total de entradas nos braços fechados (EBF) do labirinto em cruz elevado. CN= Bem nutrido não-estimulado; CE= Bem nutrido estimulado; MN= desnutrido não-estimulado; ME= desnutrido estimulado.

Com relação ao percentual de entradas nos braços abertos (%EBA), segundo a ANOVA, houve diferença para os fatores: dieta [$F_{(1,44)} = 9,01$; $p < 0,01$] e estimulação [$F_{(1,44)} = 4,10$; $p < 0,05$], com os desnutridos entrando mais nos braços abertos em comparação aos bem nutridos. Também houve efeito de interação entre os fatores dieta e estimulação [$F_{(1,44)} = 14,76$; $p < 0,001$], sendo possível observar que ratos pertencentes ao grupo ME ($22\% \pm 5\%$) apresentaram percentuais de EBA semelhantes a ratos pertencentes aos grupos CN ($16\% \pm 4\%$) e CE ($22\% \pm 2\%$) (Figura 7). A ANOVA também mostrou que, em relação ao percentual do tempo de permanência nos braços abertos (%TBA), houve diferenças significativas com relação ao fator dieta [$F_{(1,44)} = 9,08$; $p < 0,01$], mostrando que ratos desnutridos permanecem mais tempo nos braços abertos do LCE em comparação aos ratos bem nutridos. Também é possível observar efeito estatístico com relação à interação entre os fatores dieta e estimulação [$F_{(1,44)} = 9,01$; $p < 0,01$], onde ratos do grupo ME ($6\% \pm 2\%$) apresentam %TBA semelhantes a ratos do grupo CN ($8\% \pm 2\%$) (Figura 7).

Figura 7: Percentual de EBA e TBA no labirinto em cruz elevado. * $p < 0,01$: grupo desnutrido comparado ao grupo bem nutrido; # $p < 0,001$: MN comparado com CN, CE e ME; ## $p < 0,01$ M: comparado com CN, CE e ME. CN= Bem nutrido não-estimulado; CE= Bem nutrido estimulado; MN= desnutrido não-estimulado; ME= desnutrido estimulado.

Com relação ao comportamento de mergulhar desprotegido (realizado nos braços abertos) no LCE, a análise estatística mostrou que não houve diferença para os fatores dieta e estimulação. Já com relação aos mergulhos protegidos (realizados no centro e nos braços fechados), a ANOVA apontou diferença em relação aos fatores dieta [$F_{(1,44)}=7,40$; $p < 0,01$] e estimulação [$F_{(1,44)}=5,34$; $p < 0,05$] mostrando que ratos desnutridos mergulham menos que ratos bem nutridos e que ratos desnutridos e estimulados mergulham mais que ratos na mesma condição alimentar e semelhantemente a ratos bem nutridos e não estimulados (Figura 8).

Figura 8: Total de mergulhos protegidos e desprotegidos realizados no labirinto em cruz elevado. * $p < 0,01$: grupo desnutrido comparado com grupo bem nutrido; # $p < 0,05$: MN comparado com ME. CN= Bem nutrido não-estimulado; CE= Bem nutrido estimulado; MN= desnutrido não-estimulado; ME= desnutrido estimulado.

Em relação ao comportamento de esticar protegido, a ANOVA apontou que houve diferença para os fatores dieta [$F_{(1,44)}=11,29$; $p<0,01$] e estimulação [$F_{(1,44)}=9,34$; $p<0,05$], mostrando que ratos desnutridos realizam uma menor frequência deste comportamento em relação aos bem nutridos. Os dados também mostram que ratos estimulados realizam mais esticamentos em comparação a ratos não-estimulados. No que se refere ao comportamento de esticar desprotegido, da mesma maneira que o comportamento de mergulhar, não houve efeito para os fatores dieta e estimulação (Figura 9).

Figura 9: Total de esticamentos protegidos e desprotegidos realizados no labirinto em cruz elevado. * $p<0,01$: grupo desnutrido comparado com grupo bem nutrido; # $p<0,01$: MN comparado com ME. CN= Bem nutrido não-estimulado; CE= Bem nutrido estimulado; MN= desnutrido não-estimulado; ME= desnutrido estimulado.

Em relação ao comportamento de levantar nos braços abertos, a ANOVA não mostrou qualquer efeito em relação aos fatores dieta e estimulação. Já em relação ao levantar nos braços fechados, a análise estatística apontou que há diferença significativa em relação ao fator dieta [$F_{(1,44)}=46,78$; $p<0,001$], mostrando que ratos submetidos à desnutrição, independente da estimulação a que foram submetidos, apresentaram uma menor quantidade de levantamentos nos braços fechados quando comparado com ratos bem nutridos. Já com relação ao fator estimulação, a ANOVA não mostrou diferença significativa para o comportamento de levantar nos braços fechados (Figura 10).

Figura 10: Total de levantamentos realizados nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. * $p < 0,01$: grupo desnutrido comparado com grupo bem nutrido. CN= Bem nutrido não-estimulado; CE= Bem nutrido estimulado; MN= desnutrido não-estimulado; ME= desnutrido estimulado.

4.3 Expressão de RNAm do receptor de GR no Hipocampo através de PCR em tempo real

Não houve diferença significativa na expressão de RNAm de GR no hipocampo em relação ao fator dieta. A análise estatística mostrou que há uma diferença significativa de CNnT com relação à CNT ($t_{(10)}=2,38$; $p < 0,05$), de CNT com relação a CET ($t_{(10)}=2,57$; $p < 0,05$), mostrando que não há diferença na expressão de RNAm de GR no Hipocampo decorrente da diferença da dieta. No entanto, é possível observar uma diminuição da expressão devido a exposição do LCE em animais Bem nutridos o que não ocorre em animais estimulados na mesma condição de dieta. A análise estatística também demonstrou que há diferença significativa de MNnt com relação a MNT ($t_{(10)}=2,24$; $p < 0,05$), entre MNT e MET ($t_{(11)}=4,48$; $p < 0,05$) e entre MEnT e MET ($t_{(10)}=3,65$; $p < 0,05$), mostrando que animais desnutridos apresentaram aumento na expressão de RNAm do GR hipocampo quando expostos ao teste do LCE. Os dados também apontam que animais desnutridos e submetidos ao enriquecimento ambiental apresentaram uma diminuição da expressão de GR semelhantemente aos ratos bem nutridos não-estimulados (Figura 11).

Figura 11. Expressão relativa do RNAm de GR no hipocampo em ratos desnutridos e Bem nutridos, submetidos ou não ao enriquecimento ambiental e expostos ou não ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Dados expressos em médias $\pm$ EPM. (B) * $p < 0,05$ comparado com CNnT; (C) ** $p < 0,05$ comparado com CNT; (D) # $p < 0,05$ comparado com MNnT; (E) ## $p < 0,05$ comparado com MNT (F) ### $p < 0,05$ comparado com MEnT. CNnT= Bem nutrido não-estimulado não testado no LCE; CNT= Bem nutrido não-estimulado testado no LCE; . CEnT= Bem nutrido estimulado não testado no LCE; CET= Bem nutrido estimulado testado no LCE; MNnT= desnutrido não-estimulado não testado no LCE; MNT= desnutrido não-estimulado testado no LCE; MEnT desnutrido estimulado não testado no LCE; MET= desnutrido estimulado testado no LCE

4.4 Corticosterona Plasmática

Em relação aos níveis de corticosterona plasmática, a ANOVA apontou diferença estatística para o fator teste [$F_{(1,26)}=20,68$; $p<0,001$], mostrando que ratos testados, independentemente manipulação a qual foram submetidos, apresentam maiores níveis de corticosterona plasmática que ratos não testados. É importante destacar que o grupo ME possui níveis de corticosterona plasmática ($3,57\pm0,83$) próximos aos níveis de CE ($2,07\pm0,58$) em $\mu\text{g/dl}$ (Tabela 2).

Tabela 2: Corticosteronaplasmática em $\mu\text{g/dl}$, coletada após exposição ao LCE. * $p<0,05$ em relação a CE; # $p<0,05$ em relação a CET.

Grupos	$\mu\text{g/dl}$	EPM	Grupos	$\mu\text{g/dl}$	EPM
CE	2,08	$\pm 0,59$	ME	3,57	$\pm 0,83$
CET*	9,09	$\pm 1,09$	MET*#	4,74	$\pm 1,01$

4.5 Imunofluorescência de receptores GR no hipocampo

A análise qualitativa observada através da técnica de imunofluorescência no hipocampo mostrou que há uma diferença na quantidade de receptores GR no hipocampo de ratos desnutridos quando comparados com ratos submetidos à dieta contendo 16% de proteína (Figura 12). A quantidade de receptores GR em animais desnutridos é menor em comparação a de ratos bem nutridos.

A

B

Figura 12: Expressão de receptores GR no hipocampo: (A) rato pertencente ao grupo CN; (B) rato rtencente ao grupo MN.

Também é possível observar que há uma diferença significativa de receptores GR no hipocampo ao se comparar ratos pertencentes ao grupo MN e ME (Figura 13). Onde animais MN apresentam uma menor quantidade (faixa mais estreita) de GR em comparação a ME.

A

B

Figura 13: Expressão de receptores GR no hipocampo: (A) rato pertencente ao grupo MN; (B) rato pertencente ao grupo ME.

No entanto, também é possível observar que a expressão de receptores GR no hipocampo de ratos ME é semelhante à de ratos CN, sendo que, em ambos, a faixa de receptores GR observada é praticamente do mesmo tamanho (Figura 14).

Figura 14: Expressão de receptores GR no hipocampo: (A) rato pertencente ao grupo CN; (B) rato pertencente ao grupo ME.

5. Discussão

5.1 Peso Corporal

Em relação ao peso corporal, o presente trabalho mostrou que a dieta hipoproteica (contendo apenas 6% de proteína), que foi imposta às ratas-mães a partir do dia de nascimento das ninhadas, resultou em uma expressiva diminuição do peso corporal dessas ratas, sendo que tal perda de peso é ainda mais evidente a partir da segunda semana dos filhotes, como já foi demonstrado em outros estudos (Cabral & Almeida, 2008; Cambraia, Vannucchi, & De-Oliveira, 1997; Hernandez & Almeida, 2003; Pereira-da-Silva, Cabral-Filho, & de-Oliveira, 2009).

Algumas das possíveis explicações para a perda de peso observada podem ser: o gasto da energia para a produção de leite materno, cuidado com a prole, além da alimentação contínua com uma dieta pobre em proteína (Cambraia et al., 1997; Cristina, Bello, & Riul, 2005; Fukuda et al., 2007). Também foi possível observar que houve uma perda de peso das ratas-mães do grupo bem nutrido, sendo que esta perda é mais sutil quando comparada com a perda de peso das ratas do grupo desnutrido. Da mesma maneira que com as ratas do grupo desnutrido, a produção de leite e o cuidado com a prole também podem ser considerados possíveis causas para a perda de peso nas ratas pertencentes ao grupo bem nutrido (Cristina et al., 2005; Riul et al., 1999).

Já com relação ao peso corporal das ninhadas pertencentes ao grupo desnutrido é possível observar um baixíssimo ganho de peso em comparação ao grupo Bem nutrido, principalmente no período de pós-lactação, que pode ser considerado como decorrente da dieta hipoproteica desde o dia de nascimento, mesmo que imposta indiretamente no período de lactação, conforme vem sendo mostrados em outros estudos (Fukuda et al., 2007; Rocinholi, Almeida, & De-Oliveira, 1997). O fato dos ratos, no período de pós-lactação, alimentarem-se exclusivamente com a ração experimental contendo apenas 6% de proteína, sem que haja uma “complementação” alimentar, como o leite materno, como acontecia no período de lactação, pode resultar em um baixíssimo ganho de peso, conforme já vem sendo demonstrado por outros autores (Cabral & Almeida, 2008; De Oliveira & Almeida, 1985; Françolin-Silva & Almeida, 2004; Françolin-Silva et al., 2006; Hernandez &

Almeida, 2003); logo, a desnutrição proteica imposta no período crítico de desenvolvimento pode diminuir significativamente o ganho de peso corporal de ratos.

Sabe-se que a estimulação ambiental pode proporcionar seus efeitos mais significativos quando realizada no período crítico do desenvolvimento pós-natal, até cerca dos 35 dias de vida (Rosenzweig et al., 1968; Will et al., 2004). Dessa forma, a diferença de peso entre ratos estimulados e não estimulados durante o período de lactação pode ser decorrente do fato desses animais trocarem de ambiente e interagirem com objetos de formatos e texturas diferentes (enriquecimento ambiental) e entre si.

No entanto, os dados obtidos no presente trabalho são contraditórios ao que foi observado por Lima (1999), onde não foi demonstrada qualquer influência da estimulação no peso dos ratos submetidos ao enriquecimento ambiental. Tal divergência pode ser explicada pelo fato de o animal, no estudo citado, ter sido mantido em um ambiente enriquecido, ao passo que no presente trabalho o animal foi exposto por apenas 1 hora por dia ao ambiente enriquecido. No entanto, em um trabalho mais recente, (Beale et al., 2011), não foi observada qualquer alteração do peso corporal em ratos que foram criados em um ambiente enriquecido, semelhantemente ao de Lima e colaboradores (1999), em comparação com ratos criados em condição padrão de laboratório.

A desnutrição, quando imposta durante o período crítico do desenvolvimento neonatal do SNC, é extremamente prejudicial, podendo acarretar efeitos considerados irreversíveis para o desenvolvimento cerebral (De Oliveira & Almeida, 1985; Françolin-Silva et al., 2006; Morgane et al., 2002). A desnutrição proteica pode acarretar uma redução da ramificação dendrítica, do número de terminais sinápticos e da mielinização em todo SNC (Diamond et al., 1964; Rosenzweig & Bennett, 1996; Rosenzweig et al., 1968). É sabido também que a desnutrição proteica pode também alterar o nível de corticosteroide circulante (Adlard & Smart, 1972), interferindo diretamente no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e consequentemente modificando a resposta de estresse do organismo.

5.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Com relação aos comportamentos observados no labirinto em cruz elevado (LCE), notou-se que houve um maior percentual de tempo de permanência e entradas, nos braços abertos, de ratos submetidos à desnutrição proteica em comparação com ratos bem nutridos,

tal fato já vem sendo demonstrado em uma grande quantidade de trabalhos do nosso laboratório (Almeida et al., 1993, 1996; Almeida, de Oliveira, & Graeff, 1991; Bessa, Oliveira, Cerqueira, Almeida, & Sousa, 2005; Cabral & Almeida, 2008; Françolin-Silva & Almeida, 2004; Françolin-Silva et al., 2006; Sampaio et al., 2008), evidenciando os efeitos da desnutrição proteica precoce sobre o comportamento relacionado à resposta de ansiedade.

A maior quantidade de entradas nos braços abertos, observada no LCE, não pode ser atribuída a uma alteração nas atividades locomotoras, até porque não há diferenças no número de entradas nos braços fechados. Dessa maneira, o grande número de entradas nos braços abertos pode ser considerado como uma alteração na resposta de ansiedade devido a um prejuízo na avaliação de risco causado pelas consequências da desnutrição precoce (Almeida et al., 1991; Françolin-Silva et al., 2006; Hernandez, Françolin-Silva, Valadares, Fukuda, & Almeida, 2005; Soares et al. 2012).

Para alguns pesquisadores, a avaliação dos riscos é o componente central de um padrão de ansiedade, enquanto as reações a uma ameaça atual são melhor caracterizadas como uma possível resposta de medo. Tal diferenciação é correlata com a definição clínica de ansiedade, onde o padrão de avaliação de risco também mostra características de latência e duração mais relacionadas à ansiedade do que ao medo (Graeff & Zangrossi, 2010).

O prejuízo na avaliação de risco pode ser observado através de um conjunto de comportamentos que são caracterizados por uma maior impulsividade do animal frente a uma situação potencialmente perigosa (Blanchard, Blanchard, Tom, & Rodgers, 1990; Carobrez & Bertoglio, 2005; Cruz et al., 1994). De maneira geral, as respostas comportamentais classificadas como "avaliação de risco" são caracterizadas por uma abordagem de verificação de estímulos potencialmente perigosos ou situações acompanhadas de mudanças características na postura e no movimento (Blanchard & Blanchard, 1989; Grant, 1963; Van Der Poel, 1979).

Ao invés de permanecer em um local protegido e com baixa luminosidade (como os braços fechados do labirinto), realizando comportamentos de avaliação de risco (como mergulhos e esticamentos) para somente depois entrar em um espaço aberto e desprotegido (como os braços abertos) e permanecer ali um pequeno intervalo de tempo, o rato que possui um prejuízo na avaliação de risco entra e permanece um longo período no local aberto e pouco protegido, não realizando ou realizando poucos comportamentos de avaliação de risco antes de entrar no braço aberto, caracterizando esta maior impulsividade do rato (Blanchard et al., 1990). Essa topografia de comportamentos pode ser claramente observada nos ratos que

foram submetidos à desnutrição em comparação aos ratos bem nutridos (Almeida et al., 1991, 1993; Hernandez & Almeida, 2003).

O prejuízo na avaliação de risco tem como causa direta a imposição da dieta pobre em proteína imposta desde o dia do nascimento dos ratos, esta por sua vez pode ter resultado em um prejuízo da maturação de estruturas cerebrais como o hipocampo e a amígdala, estruturas diretamente envolvidas na inibição comportamental (Carobrez & Bertoglio, 2005; McNaughton & Gray, 2000). Dessa maneira, é possível afirmar que a desnutrição proteica neonatal pode prejudicar a avaliação de risco em modelos mais naturalistas do comportamento, como é o caso do LCE (Françolin-Silva et al., 2006; Hernandez & Almeida, 2003).

O enriquecimento ambiental se mostrou como um “protetor” em relação aos efeitos da desnutrição proteica precoce sobre o comportamento no LCE. Os ratos desnutridos precocemente e que foram submetidos ao enriquecimento ambiental durante 1 hora diária apresentaram comportamentos de avaliação de risco (como quantidade de entradas e tempo de permanência nos braços abertos) semelhantes aos dos ratos bem nutridos e diferentes dos apresentados pelos ratos desnutridos sem qualquer tipo de estimulação.

Os efeitos da estimulação através do enriquecimento ambiental sobre o comportamento observado no LCE já vem sendo analisado através de outros estudos (Fernández-Teruel et al., 1997; Fernández-Teruel et al., 2002; Hattori et al., 2007; Levitsky & Barnes, 1972). Como também os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento no LCE de ratos desnutridos precocemente também vêm sendo observados através de outro estudo de nosso laboratório (Soares et al., 2012).

O comportamento diferenciado dos ratos expostos ao ambiente enriquecido pode ser explicado por meio da manipulação do ambiente em si. O contato anterior com rampas e plataformas durante o período de desenvolvimento pode ter modificado a resposta desses animais no LCE. Isso poderia indicar um possível efeito protetor, induzido pelo enriquecimento ambiental, no desenvolvimento de estruturas do sistema límbico do animal (Soares et al., 2012).

A exposição diária ao ambiente enriquecido, quando realizada no período crítico de maturação do SNC (entre o dia 0 e o 35º dia de vida), pode vir a apresentar determinadas alterações morfológicas e fisiológicas, exercendo influência direta não somente sobre as respostas comportamentais apresentadas no LCE (Peña, Prunell, Dimitsantos, Nadal, &

Escorihuela, 2006; Peña, Prunell, Rotllant, Armario, & Escorihuela, 2009; Will et al., 2004) como também no desenvolvimento e na maturação do SNC (Artola et al., 2006; Cancedda et al., 2004; Diamond et al., 1964; Stowe, Liu, Curtis, Freeman, & Wang, 2005; Will et al., 2004). Segundo outros estudos, o enriquecimento ambiental pode resultar em uma maior ativação dos mecanismos de plasticidade cerebral (Carughi, Carpenter, & Diamond, 1989; Johansson & Belichenko, 2002; Nithianantharajah, Levis, & Murphy, 2004; van Praag et al., 2000), o que pode caracterizar um assim chamado “efeito protetor” em relação a alterações que podem ser ocasionadas, no SNC, pela desnutrição proteica precoce em ratos.

Ainda com relação à plasticidade cerebral induzida pela exposição diária ao ambiente enriquecido, foi demonstrado que animais submetidos a danos cerebrais e expostos ao ambiente enriquecido apresentaram, após um determinado tempo, áreas do sistema nervoso central sem dano algum, evidenciando o efeito neuroprotetor da estimulação ambiental (Will et al., 2004).

5.3 Expressão de RNAm dos receptores de Glicocorticóides (GR) no hipocampo

A diminuição da expressão de RNAm de GR no hipocampo em ratos bem nutridos, uma hora após a exposição ao LCE, pode ser considerada como o resultado de um ajustamento do funcionamento do eixo HPA.

O hipocampo atua como uma espécie de interface cerebral onde recebe informações de zonas sensoriais do cérebro como o córtex, e este, por sua vez, projeta para outras áreas a fim de que haja uma resposta adequada do organismo (Rodgers et al., 2012). No caso da resposta do estresse e do funcionamento do eixo HPA, o hipocampo, através de suas projeções para o hipotálamo, pode ativar ou inibir o funcionamento do eixo através da estimulação no hipotálamo (Adlard & Smart, 1972; Ayala, 2002).

Sabe-se que o funcionamento do eixo e consequentemente a liberação de CORT é regulada pelos receptores GR, presentes em diversas partes no cérebro e principalmente no hipocampo e hipotálamo (Graeff, 2003; Juruena et al., 2004; Kehoe et al., 2001; Meijer et al., 2005). Tal funcionamento é regulado através de um mecanismo de *feedback* negativo que tem como função regular o aumento dos níveis de CORT, onde o próprio aumento da CORT ativa os receptores de GR no hipocampo e hipotálamo, inibindo a produção de GR e CRH e consequentemente diminuindo a produção de CORT pela adrenal. Todo esse funcionamento é

decorrente da exposição a um evento estressor ou potencialmente estressor, neste caso, a exposição ao LCE (Korte, 2001).

Além de alterar os níveis de CORT, a desnutrição proteica precoce pode alterar a atividade de receptores GR no hipocampo. Ratos desnutridos apresentaram, no presente estudo, aumento da expressão de RNAm de receptores GR no hipocampo após o teste do LCE, enquanto que ratos bem nutridos apresentaram uma diminuição da expressão de receptores GR após o teste. Tal fato pode indicar que a desnutrição proteica precoce tem ação direta sobre a sensibilidade do eixo HPA, frente a eventos potencialmente estressantes, mostrando que a adaptação do sistema simplesmente não ocorre, evidenciando uma possível falha no mecanismo de *feedback* negativo em resposta ao aumento de corticosterona circulante.

Foi demonstrado que a expressão de RNAm de GR no hipocampo e em outras regiões do cérebro não é apenas regulada pela circulação de glucocorticoides, como a CORT (Makino, Kaneda, Nishiyama, Asaba, & Hashimoto, 2001). Em outro estudo foi discutida a possibilidade do RNAm de GR no hipocampo ser regulado negativamente em situações de estresse, mostrando que a baixa expressão de GR no hipocampo, observada através da imunofluorescência, pode ser compatível com a alta expressão de RNAm de GR no hipocampo, observada através do PCR em tempo real (Nishimura, Makino, Tanaka, Kaneda, & Hashimoto, 2004).

Entretanto, ratos desnutridos, quando submetidos ao ambiente enriquecido, apresentaram a expressão de RNAm de receptores GR no hipocampo, após o teste do LCE, semelhante à dos ratos bem nutridos. Tal dado pode significar uma possível “ação protetora” do enriquecimento sobre as consequências da desnutrição proteica na atividade do eixo HPA. Tal fato pode influenciar diretamente no comportamento de avaliação de risco e impulsividade dos ratos expostos ao teste do LCE. Dessa maneira, a realização da estimulação ambiental no período crítico de desenvolvimento do SNC pode influenciar a expressão de RNAm de receptores GR no hipocampo. Foi mostrado que a componente social do enriquecimento ambiental alterou a expressão de RNAm em vários tipos de receptores em regiões corticais e na região CA1 do hipocampo, sendo que tal efeito não foi observado em ratos que não foram expostos a estimulação ambiental (Dahlqvist et al., 2003).

De acordo com alguns autores, a realização do enriquecimento ambiental na fase inicial da vida do animal pode proporcionar uma proteção em relação ao crescimento cerebral, preservando o tamanho cortical e a ramificação dendrítica, efeito já conhecido da estimulação

frente às injúrias ocasionadas no cérebro (Diamond et al., 1964; Will et al., 2004). Tal efeito da estimulação ambiental pode ser decorrente de uma maior ativação da plasticidade cerebral. Foi observada, em animais com danos cerebrais e que, no entanto, foram mantidos em um ambiente enriquecido, uma grande ativação de algumas áreas do sistema nervoso central que não foram danificadas, caracterizando o processo de plasticidade cerebral (Kelche & Will, 1982).

O “efeito protetor” proporcionado pelo enriquecimento ambiental pode também ser resultado de processos epigenéticos (Baroncelli et al., 2010), mostrando que a aprendizagem e a memória podem ser processos que também envolvem mudanças epigenéticas, produzindo efeitos duradouros, como, por exemplo, a alteração da plasticidade cerebral (Covic, Karaca, & Lie, 2010; Meaney, 2001). As alterações epigenéticas resultam em modificação do funcionamento da cromatina, modulando a acetilação das histonas (Baroncelli et al., 2010; Covic et al., 2010; Meaney, 2001), interferindo diretamente na síntese de proteína a partir da leitura do RNAm sobre o DNA (Covic et al., 2010; Meaney & Aitken, 1985; Meaney, 2001). Dessa maneira, a epigênese, ocasionada pela estimulação ambiental, tem ação direta na síntese do RNA na célula, neste caso, células cerebrais, o que poderia estar afetando diretamente a plasticidade cerebral e o funcionamento do cérebro.

5.4 Imunofluorescência de receptores GR no hipocampo

A redução da expressão de receptores GR no hipocampo mostra o efeito deletério da desnutrição proteica sobre a maturação do hipocampo, assunto que já vem sendo demonstrado por alguns estudos (Cintra et al., 1997; Kehoe et al., 2001; Levitsky & Barnes, 1972; Morgane et al., 2002). Tais dados mostram que a desnutrição protéica pode acarretar em um prejuízo sobre o desenvolvimento do hipocampo, em ratos submetidos à desnutrição proteica quando comparados com ratos bem nutridos, podendo resultar em uma alteração na expressão de receptores GR nesta estrutura cerebral.

Confirmando os resultados já observados, como em relação à estimulação ambiental e à expressão de RNAm de GR no hipocampo, foi possível observar que a quantidade de receptores de GR no hipocampo de ratos desnutridos e expostos ao enriquecimento ambiental é semelhante ao de ratos bem nutridos e não estimulados. Mostrando o efeito de neuroproteção do enriquecimento ambiental sobre o desenvolvimento do hipocampo,

confirmando os efeitos da estimulação ambiental frente às consequências da desnutrição proteica precoce, confirmando o que foi observado por Diamond e colaboradores (1964) e Will e colaboradores (2004). Foi observado também que a estimulação ambiental pode induzir o aumento da densidade dos receptores Glicocorticóides no hipocampo, alterando sua morfologia, o que pode vir a interferir diretamente no *feedback* negativo (Gomes et al., 1999; Liu et al., 1997; Smythe et al., 1994; Wigger & Neumann, 1999).

Tal efeito pode ser relacionado a uma maior ativação da plasticidade cerebral. De acordo com Meaney e Aitken (1985), a estimulação pós-natal pode ter um efeito mais eficaz quando realizada no período considerado como crítico para o desenvolvimento pós-natal do SNC, dessa forma, o enriquecimento ambiental poderia alterar a sensibilidade e a atividade de estruturas e vias cerebrais (Gomes et al., 1999; Jutapakdeegul et al., 2003).

Sabe-se que o córtex cerebral de animais expostos ao ambiente enriquecido pode vir a apresentar uma maior espessura (Diamond et al., 1964; Rosenzweig & Bennett, 1996; Rosenzweig et al., 1968). Uma das razões para a maior espessura do córtex pode ser o aumento do tamanho dos neurônios, o número e o comprimento dos dendritos e o aumento de espinhas dendríticas, proporcionados pela exposição contínua ao ambiente enriquecido (Diamond et al., 1964; Will et al., 2004). Dessa maneira, a alteração na quantidade de receptores de GR no hipocampo também pode ser decorrente de um aumento do número de neurônios no hipocampo durante a maturação (Leal-Galicia, Castañeda-Bueno, Quiroz-Baez, & Arias, 2008), além de um possível aumento na plasticidade cerebral após injúrias realizadas no SNC (Baroncelli et al., 2010; Pereira et al., 2007b).

5.5 Corticosterona Plasmática

Os níveis de corticosterona plasmática circulante (CORT) também podem ser alterados pela desnutrição proteica conforme já foi demonstrado por Sampaio e colaboradores (2008), confirmando o estudo de Adlard & Smart (1972). No presente trabalho, ratos desnutridos, e expostos ao enriquecimento ambiental, apresentaram níveis próximos de CORT aos de ratos bem nutridos, observado por Sampaio e colaboradores (2008) após a exposição ao teste do LCE. Enquanto ratos desnutridos, que não foram submetidos a qualquer tipo de estimulação ambiental, apresentaram níveis de corticosterona maiores quando comparado com ratos bem nutridos. Tal fato confirma que a desnutrição proteica tem influência sobre a

resposta de estresse do rato observado através dos níveis de CORT. No entanto, o enriquecimento ambiental, realizado no período crítico do desenvolvimento do SNC, pode vir a ter um “efeito protetor” sobre os efeitos da desnutrição precoce sobre a resposta ao estresse de animais desnutridos e atuando diretamente sobre o funcionamento do eixo HPA, também observado através dos níveis de CORT.

Ratos submetidos à desnutrição precoce apresentaram níveis significativamente maiores de CORT quando comparados com ratos mantidos em condições padrão (Sampaio et al., 2008). O aumento dos níveis de CORT é decorrente de uma alteração da resposta adrenocortical ao estresse (Adlard & Smart, 1972), evidenciando uma alteração no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), mostrando que a desnutrição proteica pode influenciar diretamente a atividade desse eixo (Durán et al., 2006b; Kehoe et al., 2001).

O aumento do nível de CORT, observado nos ratos desnutridos, pode ser decorrente de uma maior ativação de receptores Glicocorticóides (GR) no hipocampo, sendo que tal fato pode ser observado através da alteração na expressão de RNAm dos receptores GR, que pode estar caracterizando uma hiperatividade do eixo (Calfa, Volosin, & Molina, 2006; Korte, 2001). Os níveis aumentados da CORT de ratos expostos ao LCE, comparado com os ratos não expostos ao aparato, fortalecem o conceito de que receptores GR no hipocampo podem estar envolvidos na mediação da resposta de ansiedade (Calfa et al., 2006; Korte, 2001; McCormick, Smith, & Mathews, 2008; Sampaio et al., 2008).

Para alguns autores, a CORT liberada em resposta a estímulos aversivos é mediada pela ação de receptores GR (Calfa et al., 2006; Fan, Wang, Guo, Wei, & Zhao, 2010), e esta pode vir a influenciar no ajustamento comportamental frente a situações potencialmente aversivas. Ratos expostos cronicamente a situações potencialmente estressantes, como a desnutrição proteica precoce, apresentam diferentes respostas comportamentais relacionadas com a ansiedade, como um aumento no número de entradas nos braços abertos do LCE (Sampaio et al., 2008), sendo que tais respostas ocorrem concomitante ao aumento dos níveis de CORT (Calfa et al., 2006; McCormick et al., 2008; Sampaio et al., 2008).

Foi demonstrado que roedores submetidos ao teste do LCE, que não foram expostos a qualquer tipo de estresse intencional, apresentaram um aumento significativo dos níveis de CORT quando comparados com animais não testados no LCE que também não foram submetidos a qualquer tipo de agente estressor (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985).

Evidencia-se, também, que a exposição do rato ao LCE pode alterar os níveis de CORT, como foi demonstrado mais tarde por Korte (2001).

No presente trabalho ratos desnutridos, e expostos ao enriquecimento ambiental, apresentaram níveis próximos de CORT aos de ratos bem nutridos após a exposição ao teste do LCE, enquanto ratos desnutridos, que não foram submetidos a qualquer tipo de estimulação ambiental, apresentaram níveis de corticosterona maiores quando comparados com ratos bem nutridos. Tal fato confirma que a desnutrição proteica tem influência sobre a resposta de estresse do rato observado através dos níveis de CORT. No entanto, o enriquecimento ambiental, realizado no período crítico do desenvolvimento do SNC, pode vir a ter um “efeito protetor” sobre os efeitos da desnutrição precoce sobre a resposta ao estresse de animais desnutridos e atuando diretamente sobre o funcionamento do eixo HPA, também observado através dos níveis de CORT.

Também foi demonstrado (Welberg, Thiruvikraman, & Plotsky, 2006) que o enriquecimento ambiental neonatal alterou a sensibilidade do eixo HPA em relação à produção de CORT frente ao estresse crônico. Entretanto, em outro estudo, foi demonstrado que ratos que foram expostos ao ambiente enriquecido apresentaram maiores níveis de CORT e de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) em comparação a ratos não estimulados. Tal fato pode ter como explicação o aumento de peso da adrenal, bem como o aumento do conteúdo da corticosterona adrenal (Moncek, Duncko, Johansson, & Jezova, 2004). Dessa maneira, pode-se afirmar que o enriquecimento ambiental pode influenciar a sensibilidade do eixo HPA, alterando os níveis de CORT.

CONCLUSÕES

6. Conclusão

Concluimos, a partir do presente estudo, que a desnutrição proteica, quando imposta no início da vida, pode ter consequências que resultam em prejuízos na avaliação de risco no teste do labirinto em cruz elevado, aumentando a impulsividade do rato nesse aparato. A desnutrição proteica mostra também efeitos sobre a resposta de estresse, observada pelos níveis de corticosterona plasmática circulante, e consequentemente sobre a sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, observado através da expressão de RNAm de receptores GR e dos próprios receptores de GR no hipocampo.

No entanto, o enriquecimento ambiental, quando realizado no período crítico de amadurecimento do SNC, pode exercer um efeito protetor em relação às consequências da desnutrição proteica precoce sobre o comportamento e desenvolvimento neonatal.

Foi observado que a estimulação ambiental, através da realização de uma hora diária de enriquecimento ambiental, proporcionou efeito protetor com relação às respostas de ansiedade e do comportamento de avaliação de risco no labirinto em cruz elevado. Também foi possível observar o efeito de neuroproteção do enriquecimento ambiental sobre o funcionamento do eixo HPA através da expressão de RNAm de receptores GR no hipocampo, do nível de corticosterona plasmática circulante e da expressão de receptores de GR, em que ratos desnutridos precocemente apresentaram escores semelhantes a ratos bem nutridos não estimulados.

Dessa forma, a estimulação ambiental, através da exposição ao enriquecimento ambiental, favorece a ativação da plasticidade cerebral e consequentemente preserva o desenvolvimento “normal” do cérebro, mais precisamente em neurônios hipocampais, atribuindo ao cérebro um efeito de “neuroproteção” em relação aos efeitos deletérios da desnutrição proteica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- Adlard, B. P. F., & Smart, J. L. (1972). Adrenocortical function in rats subjected to nutritional deprivation in early life. *Journal of Endocrinology*, 54(1), 99-105.
- Almeida, S. S., Garcia, R. A., & de Oliveira, L. M. (1993). Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior*, 54(4), 749-52.
- Almeida, S. S., Tonkiss, J., & Galler, J. R. (1996). Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20(3), 389-402.
- Almeida, S. S., de Oliveira, L. M., & Graeff, F. G. (1991). Early life protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity to anxiolytics. *Psychopharmacology*, 103(4), 513-8.
- Ansari, D. (2008). Effects of development and enculturation on number representation in the brain, *Nature Reviews Neuroscience* (9), 278-291.
- Artola, A., Von Frijtag, J. C., Fermont, P. C., Gispen, W. H., Schrama, L. H., Kamal, A., & Spruijt, B. M. (2006). Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 23(1), 261-272.
- Ayala, A. R. (2002). Antagonistas do hormônio liberador da corticotrofina: atualização e perspectivas. *Arquivos Brasil Endocrinologia e Metabolismo*, 46, 619-625.
- Barnes, R. H. (1976). Dual role of environmental deprivation and malnutrition in retarding intellectual development. AG Hogan Memorial Lecture. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 29(8), 912-917
- Baroncelli, L., Braschi, C., Spolidoro, M., Begenisic, T., Sale, A., & Maffei, L. (2010). Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. *Cell Death & Differentiation*, 17(7), 1092-1103.
- Batista Filho, M., & Rissin, A. (2003). A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cadernos de Saúde Pública*, 19, S181-S191.

- Beale, K. E., Murphy, K. G., Harrison, E. K., Kerton, A. J., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., & Smith, K. L. (2011). Accurate Measurement of Body Weight and Food Intake in Environmentally Enriched Male Wistar Rats. *Obesity*, 19(8), 1715-1721.
- Bertoglio, L J, & Carobrez, A P. (2000). Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 108(2), 197–203.
- Bertoglio, L. J., Anzini, C., Lino-de-Oliveira, C., & Carobrez, A. P. (2005). Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. *Behavioural Brain Research*, 162(1), 99-107.
- Bessa, J. M., Oliveira, M., Cerqueira, J. J., Almeida, O. F. X., & Sousa, N. (2005). Age-related qualitative shift in emotional behaviour: paradoxical findings after re-exposure of rats in the elevated-plus maze. *Behavioural Brain Research*, 162(1), 135–142.
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., Tom, P., & Rodgers, R. J. (1990). Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology*, 101(4), 511-518
- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of Comparative Psychology*, 103(1), 70.
- Cabral, A., & Almeida, S. S. (2008). Effects of tactile stimulation and underwater trauma on the behavior of protein-malnourished rats in the elevated plus-maze test. *Psychology & Neuroscience*, 1(1), 67-72.
- Calfa, G., Volosin, M., & Molina, V. A. (2006). Glucocorticoid receptors in lateral septum are involved in the modulation of the emotional sequelae induced by social defeat. *Behavioural Brain Research*, 172(2), 324–332.
- Cambraia, R. P., Vannucchi, H., & De-Oliveira, L. M. (1997). Food intake and weight of lactating rats maintained on different protein-calorie diets, and pup growth. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30(8), 985–988.
- Cancedda, L., Putignano, E., Sale, A., Viegi, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2004). Acceleration of visual system development by environmental enrichment. *The Journal of neuroscience*, 24(20), 4840-4848.
- Carobrez, a P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1193–1205.

- Carughi, A., Carpenter, K. J., & Diamond, M. C. (1989). Effect of environmental enrichment during nutritional rehabilitation on body growth, blood parameters and cerebral cortical development of rats. *The Journal of Nutrition*, 119(12), 2005–2016.
- Chapillon, P., Patin, V., Roy, V., Vincent, a, & Caston, J. (2002). Effects of pre- and postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: a review. *Developmental Psychobiology*, 41(4), 373–387.
- Cintra, L., Granados, L., Aguilar, a, Kemper, T., DeBassio, W., Galler, J., ... Díaz-Cintra, S. (1997). Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus*, 7(2), 184–191.
- Covic, M., Karaca, E., & Lie, D. C. (2010). Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. *Heredity*, 105(1), 122–134.
- Dal Bello, A. C., Riul, T. R., & de Oliveira, L. M. (2005). Desnutrição e estresse na gestação: medidas comportamentais das mães e dos filhotes durante a lactação I. *Temas em Psicologia da SBP*, 13(1), 34-44.
- Cruz, a P., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 49(1), 171–176.
- Córdoba, N. E., Arolfo, M. P., Brioni, J. D., & Orsingher, O. A. (1994). Perinatal undernutrition impairs spatial learning in recovered adult rats. *Acta physiologica, Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana* : 44(3), 70–76.
- Dahlqvist, P., Rönnbäck, a., Risedal, a., Nergårdh, R., Johansson, I.-M., Seckl, J. R., ... Olsson, T. (2003). Effects of postischemic environment on transcription factor and serotonin receptor expression after permanent focal cortical ischemia in rats. *Neuroscience*, 119(3), 643–652.
- Da Silva Hernandez, A., Françolin-Silva, A. L., Valadares, C. T., Fukuda, M. T. H., & Almeida, S. S. (2005). Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*, 162(2), 240-245.
- De Oliveira, L. M., & Almeida, S. D. S. (1985). Effects of malnutrition and environment on the acquisition and extinction of avoidance behavior in rats. *Physiology & Behavior*, 34(1), 141–145.
- Diamond, M. C. (2001). Response of the brain to enrichment. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 73(2), 211-220.

- Diamond, M. C., Krech, D., & Rosenzweig, M. R. (1964). The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 123(1), 111–119.
- Dobbing, J. (1975). Prenatal nutrition and neurological development. *UCLA Forum in Medical Sciences*, (18), 40.
- Dobbing, J., & Sands, J. (1971). Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Neonatology*, 19(4-6), 363-378.
- Durán, P., Galler, J. R., Cintra, L., & Tonkiss, J. (2006a). Prenatal malnutrition and sleep states in adult rats: effects of restraint stress. *Physiology & behavior*, 89(2), 156–163.
- Durán, P., Galler, J. R., Cintra, L., & Tonkiss, J. (2006). Prenatal malnutrition and sleep states in adult rats: effects of restraint stress. *Physiology & Behavior*, 89(2), 156–163.
- Elias, L. L., Antunes-Rodrigues, J., Elias, P. C., & Moreira, A. C. (1997). Effect of plasma osmolality on pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide changes in central diabetes insipidus. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(4), 1243-1247.
- Elias, P. C., Elias, L. L., Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., & Moreira, A. C. (2004). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis up-regulation in rats submitted to pituitary stalk compression. *Journal of Endocrinology*, 180(2), 297-302.
- Fan, H., Wang, L., Guo, F., Wei, S., & Zhao, R. (2010). Neonatal intramuscular injection of plasmid encoding glucagon-like peptide-1 affects anxiety behaviour and expression of the hippocampal glucocorticoid receptor in adolescent rats. *Journal of Biosciences*, 35(1), 63–71.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Jiménez, P., & Tobeña, A. (1990). Infantile stimulation and perinatal administration of Ro 15–1788: additive anxiety-reducing effects in rats. *European journal of Pharmacology*, 191(1), 111-114.
- Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Castellano, B., Gonzalez, B., & Tobena, A. (1997). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behavior Genetics*, 27(6), 513-526
- Feoli, A. M., Siqueira, I. R., Almeida, L., Tramontina, A. C., Vanzella, C., Sbaraini, S., ... & Gonçalves, C. A. (2006). Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition*, 22(2), 160-165.

- Françolin-Silva, a L., & Almeida, S. S. (2004). The interaction of housing condition and acute immobilization stress on the elevated plus-maze behaviors of protein-malnourished rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(7), 1035–1042.
- Françolin-Silva, A. L., da Silva Hernandez, A., Fukuda, M. T. H., Valadares, C. T., & Almeida, S. S. (2006). Anxiolytic-like effects of short-term postnatal protein malnutrition in the elevated plus-maze test. *Behavioural Brain Research*, 173(2), 310–314.
- Franklin, K. B. J., & Paxinos, G. (1997). The mouse brain in stereotaxic coordinates (Academic, San Diego).
- Fukuda, M. T. H., Françolin-Silva, A. L., Hernandez, A. S., Valadares, C. T., & Almeida, S. S. (2007). Effects of early protein malnutrition and scopolamine on learning and memory in the Morris water maze. *Nutritional Neuroscience*, 10(5-6), 5-6.
- Fukuda, M. T. H., Françolin-Silva, A. L., & Almeida, S. S. (2002). 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*, 133(2), 271-277
- Garcia-Ruiz, M., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., & Corkidi, G. (1993). Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages *Brain Research*, 625(2), 203–212.
- Gomes, C. M., Frantz, P. J., Sanvitto, G. L., Anselmo-Franci, J. A., & Lucion, A. B. (1999). Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32(10), 1239-1242.
- Graeff, F. G. (2003). Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 25, 42-45.
- Graeff, F. G., & Zangrossi Junior, H. (2010). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. *Psychology & Neuroscience*, 3(1), 3-8.
- Grant, E. C. (1963). An Analysis of the Social Behaviour of the Male Laboratory Rat. *Behaviour*, 21(3), 260–281.
- Gray, J. A. (1978). The Neuropsychology of Anxiety. *British Journal of Psychology* 69(4), 417–434
- Hattori, S., Hashimoto, R., Miyakawa, T., Yamanaka, H., Maeno, H., Wada, K., & Kunugi, H. (2007). Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice

and the survival of newborn cells in their hippocampi. *Behavioural Brain Research*, 180(1), 69–76.

Hermel, E. E., Severino, G. S., Cecconello, a L., Pereira, F. M., Sanvitto, G. L., & Lucion, a B. (2001). Neonatal handling and the expression of immunoreactivity to tyrosine hydroxylase in the hypothalamus of adult male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34(9), 1191–1195.

Hernandes, A. S., & Almeida, S. S. (2003). Postnatal Protein Malnutrition Affects Inhibitory Avoidance and Risk Assessment Behaviors in Two Models of Anxiety in Rats. *Nutritional Neuroscience*, 6(4), 213–219.

Johansson, B. B., & Belichenko, P. V. (2002). Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 22(1), 89–96.

Juruena, M. F., Cleare, A. J., & Pariante, C. M. (2004). The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 26(3), 189-201.

Jutapakdeegul, N., Casalotti, S. O., Govitrapong, P., & Kotchabhakdi, N. (2003). Postnatal Touch Stimulation Acutely Alters Corticosterone Levels and Glucocorticoid Receptor Gene Expression in the Neonatal Rat. *Developmental Neuroscience*, 25(1), 26–33.

Kehoe, P., Mallinson, K., Bronzino, J., & McCormick, C. M. (2001). Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness. *Brain Research. Developmental brain research*, 132(1), 23–31.

Kelche, C., & Will, B. (1982). Effects of postoperative environments following dorsal hippocampal lesions on dendritic branching and spines in rat occipital cortex. *Brain Research*, 245(1), 107–115.

Kloet, R. E., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S. & Joëls, M. (1998) Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. *Endocrine Reviews* 19(3): 269–301

Korte, S. M. (2001). Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(2), 117–142.

Krech, D., Rosenzweig, M. R., & Bennett, E. L. (1960). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 53(6), 509.

- Leal-Galicia, P., Castañeda-Bueno, M., Quiroz-Baez, R., & Arias, C. (2008). Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiology of Learning and memory*, 90(3), 511–518.
- Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior*, 73(3), 255–260.
- Levitsky, D. A., & Barnes, R. H. (1972). Nutritional and Environmental Interactions in the Behavioral Development of the Rat: Long-Term Effects. *Science*, 176(4030), 68–71.
- Lima, J. G., De Oliveira, L. M., & Almeida, S. S. (1999). Effects of early concurrent protein malnutrition and environmental stimulation on the central nervous system and behavior. *Nutritional Neuroscience*, 1, 439-448.
- Lister, J. P., Blatt, G. J., DeBassio, W. a, Kemper, T. L., Tonkiss, J., Galler, J. R., & Rosene, D. L. (2005). Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. *Hippocampus*, 15(3), 393–403.
- Liu, D. (1997). Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *Science*, 277(5332), 1659–1662.
- Liu, Q. Y., Schaffner, a E., Chang, Y. H., Vaszil, K., & Barker, J. L. (1997). Astrocytes regulate amino acid receptor current densities in embryonic rat hippocampal neurons. *Journal of Neurobiology*, 33(6), 848–64.
- Luebke, J., St John, J., & Galler, J. R. (2000). Prenatal protein malnutrition results in increased frequency of miniature inhibitory synaptic currents in rat CA1 pyramidal cells. *Synapse*, 37(1), 23–31.
- Mabandla, M. V., Dobson, B., Johnson, S., Kellaway, L. a., Daniels, W. M. U., & Russell, V. a. (2007). Development of a mild prenatal stress rat model to study long term effects on neural function and survival. *Metabolic Brain Disease*, 23(1), 31–42.
- Makino, S., Kaneda, T., Nishiyama, M., Asaba, K., & Hashimoto, K. (2001). Lack of Decrease in Hypothalamic and Hippocampal Glucocorticoid Receptor mRNA during Starvation. *Neuroendocrinology*, 74(2), 120–128.
- McCormick, C. M., Smith, C., & Mathews, I. Z. (2008). Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. *Behavioural Brain Research*, 187(2), 228–238.

- McIntosh, J., Anisman, H., & Merali, Z. (1999). Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain research. Developmental Brain Research*, 113(1-2), 97–106.
- McNaughton, N., & Gray, J. a. (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *Journal of Affective Disorders*, 61(3), 161–76.
- Meaney, M J, & Aitken, D. H. (1985). The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Brain research*, 354(2), 301–304.
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Neuroscience*, 24, 1161–119..
- Meijer, O. C., Topic, B., Steenbergen, P. J., Jocham, G., Huston, J. P., & Oitzl, M. S. (2005). Correlations between hypothalamus-pituitary-adrenal axis parameters depend on age and learning capacity. *Endocrinology*, 146(3), 1372–1381.
- Mesquita, R. M., Pereira, P. a, & Andrade, J. P. (2002). Low levels of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B are related to loss of dentate granule cells after prolonged low-protein feeding in the rat. *Neuroscience Letters*, 330(2), 155–158.
- Mokler, D J, Bronzino, J. D., Galler, J. R., & Morgane, P. J. (1999). The effects of median raphe electrical stimulation on serotonin release in the dorsal hippocampal formation of prenatally protein malnourished rats. *Brain Research*, 838(1-2), 95–103.
- Mokler, David J, Galler, J. R., & Morgane, P. J. (2003). Modulation of 5-HT release in the hippocampus of 30-day-old rats exposed in utero to protein malnutrition. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 142(2), 203–208.
- Moncek, F., Duncko, R., Johansson, B. B., & Jezova, D. (2004). Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(5), 423–431.
- Morgane, P J, Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., ... Galler, J. R. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17(1), 91–128.
- Morgane, Peter J, Mokler, D. J., & Galler, J. R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(4), 471–483.

- Morley-Fletcher, S., Rea, M., Maccari, S., & Laviola, G. (2003). Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *European Journal of Neuroscience*, 18(12), 3367-3374.
- Morris, G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues, *Learning and Motivation*, 260, 239-260.
- Nishimura, K., Makino, S., Tanaka, Y., Kaneda, T., & Hashimoto, K. (2004). Altered expression of p53 mRNA in the brain and pituitary during repeated immobilization stress: negative correlation with glucocorticoid receptor mRNA levels. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(1), 84-91.
- Nithianantharajah, J., Levis, H., & Murphy, M. (2004). Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81(3), 200-210.
- Palma, B. D., Tiba, P. A., Machado, R. B., Tufik, S., & Suchecki, D. (2007). Repercussões imunológicas dos distúrbios do sono: o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal como fator modulador Immune outcomes of sleep disorders: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a modulatory factor. *Revista Brasileira Psiquiatria*, 29(Supl I), S33-38.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149-67.
- Pereira, L. O., Arteni, N. S., Petersen, R. C., da Rocha, A. P., Achaval, M., & Netto, C. A. (2007). Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(1), 101-108.
- Pereira-da-Silva, M. S., Cabral-Filho, J. E., & de-Oliveira, L. M. (2009). Effect of early malnutrition and environmental stimulation in the performance of rats in the elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 205(1), 286-289.
- Peña, Y., Prunell, M., Dimitantos, V., Nadal, R., & Escorihuela, R. M. (2006). Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behavioural Brain Research*, 174(1), 181-187.
- Peña, Y., Prunell, M., Rotllant, D., Armario, A., & Escorihuela, R. M. (2009). Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34(9), 1390-1404.

- Pham, T. M., Söderström, S., Henriksson, B. G., & Mohammed, A. H. (1997). Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor. *Behavioural Brain Research*, 86(1), 113-120.
- Pham, T. M., Söderström, S., Winblad, B., & Mohammed, a H. (1999). Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. *Behavioural Brain Research*, 103(1), 63-70.
- Portal da Saúde (2010) Ministério da Saúde do Brasil em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>. acessado em 20 de janeiro de 2011.
- Pryce, C. R., & Feldon, J. (2003). Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 57-71.
- Riul, T. R., Carvalho, A. F., Almeida, P. S., De-Oliveira, L. M., & Almeida, S. S. (1999). 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*, 32(8), 975-983.
- Rocinho, L. F., Almeida, S. S., & De-Oliveira, L. M. (1997). Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30(3), 407-13.
- Rodgers, K. M., Bercum, F. M., McCallum, D. L., Rudy, J. W., Frey, L. C., Johnson, K. W., ... & Barth, D. S. (2012). Acute Neuroimmune Modulation Attenuates the Development of Anxiety-Like Freezing Behavior in an Animal Model of Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 29(10), 1886-1897.
- Rodrigues, A. L., Arteni, N. S., Abel, C., Zylbersztejn, D., Chazan, R., Viola, G., ... Netto, C. A. (2004). Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Research*, 1002(1-2), 94-9.
- Rosenzweig, M R, & Bennett, E. L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioural Brain Research*, 78(1), 57-65.
- Rosenzweig, Mark R., Love, W., & Bennett, E. L. (1968). Effects of a Few Hours a Day of Enriched Experience on Brain Chemistry and Brain Weights. *Physiology & Behavior*, 3(6), 819-825.
- Sampaio, V. D. F., de Oliveira, L. M., Almeida, S. S., Marchini, J. S., Antunes-Rodrigues, J., & Elias, L. L. K. (2008). The effects of early protein malnutrition and environmental

stimulation on behavioral and biochemical parameters in rats. *Psychology and Neuroscience*, 1(2), 109–119.

Santucci, L. B., Daud, M. M., Almeida, S. S., & de Oliveira, L. M. (1994). Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 49(2), 393–8.

Sapolsky, R. M., Krey, L. C., & McEWEN, B. S. (1985). Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *The Journal of Neuroscience*, 5(5), 1222-1227

Schanberg, S. M., & Field, T. M. (1987). Sensory deprivation stress and supplemental stimulation in the rat pup and preterm human neonate. *Child Development*, 58(6), 1431–47.

Smythe, J. W., Rowe, W. B., & Meaney, M. J. (1994). Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression.. *Developmental Brain Research*, 80(1-2), 183–9.

Soares, R. O., Oliveira, L. M., Marchini, J. S., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L. L., & Almeida, S. S. (2012). Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation on behavioral and biochemical parameters in rats submitted to the elevated plus-maze test. *Nutritional neuroscienc*

Stowe, J. R., Liu, Y., Curtis, J. T., Freeman, M. E., & Wang, Z. (2005). Species differences in anxiety-related responses in male prairie and meadow voles: the effects of social isolation. *Physiology & Behavior*, 86(3), 369–378.

Tardido, A. P., & Falcão, M. C. (2006). O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 21 (2)117–124.

Uauy, R., & Dangour, A. D. (2006). Nutrition in Brain Development and Aging : Role of Essential Fatty Acids, *Nutrition Reviews*, 64(2), 24–33.

Unicef, Fundo das Nações Unidas para a Infância (2006). *Situação da Infância Brasileira em 2006*. Brasília, D. F.: autor.

Valadares, C. T., Fukuda, M. T. H., Françolin-Silva, A. L., Hernandes, A. S., & Almeida, S. S. (2010). Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. *Nutritional Neuroscience*, 13(6), 274–282.

- Van Der Poel, a. M. (1979). A note on “stretched attention”, a behavioural element indicative of an approach-avoidance conflict in rats. *Animal Behaviour*, 27, 446–450.
- Van Pett, K., Viau, V., Bittencourt, J. C., Chan, R. K., Li, H. Y., Arias, C., ... Sawchenko, P. E. (2000). Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 428(2), 191–212.
- Van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), 191-198
- Wainwright, P. E., & Colombo, J. (2006). Nutrition and the development of cognitive functions: interpretation of behavioral studies in animals and human infants *American Journal of Clinical Nutrition*, 84 (1), 961–970.
- Welberg, L., Thiruvikraman, K. V., & Plotsky, P. M. (2006). Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 31(5), 553–564.
- Wigger, a, & Neumann, I. D. (1999). Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiology & Behavior*, 66(2), 293–302.
- Will, B., Galani, R., Kelche, C., & Rosenzweig, M. R. (2004). Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Progress in Neurobiology*, 72(3), 167–82.
- Winick, M. (1969). Malnutrition and brain development. *The Journal of Pediatrics*, 74(5), 667.
- Winick, M. (1973). Relation of nutrition to physical and mental development. *Bibliotheca Nutritio et Dieta*, (18), 114.
- Xavier, G. F., & Costa, V. C. I. (2009). Dentate gyrus and spatial behaviour. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(5), 762-773.