UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

“Desnutrição protéica precoce prejudica memória de ratos testados em diferentes
procedimentos de reconhecimento de objetos (*Rattus norvegicus*)”

Natália Nassiff Braga

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

RIBEIRÃO PRETO

-2010-

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

“Desnutrição protéica precoce prejudica memória de ratos testados em diferentes
procedimentos de reconhecimento de objetos (*Rattus norvegicus*)”

Natália Nassiff Braga

Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida

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

RIBEIRÃO PRETO

-2010-

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

Braga, Natália Nassiff

Desnutrição protéica precoce prejudica memória de ratos testados em diferentes procedimentos de reconhecimento de objetos (*Rattus norvegicus*). Ribeirão Preto, 2010.

83p. : il. ; 30 cm

Dissertação, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP – Dep. de Psicologia e Educação.

Orientador: Almeida, Sebastião de Sousa

1. desnutrição. 2. memória. 3. aprendizagem

FOLHA DE APROVAÇÃO

Natália Nassiff Braga

“Desnutrição protéica precoce prejudica memória de ratos testados em diferentes procedimentos de reconhecimento de objetos (*Rattus norvegicus*)”

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Psicologia

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Ao meu pai Nassiff, minha mãe Débora e minhas irmãs Natali e Aline

Agradeço a vocês pelo eterno carinho, dedicação e apoio e por serem meus exemplos de conduta, honestidade, educação e ética. Obrigado por sempre acreditarem em mim e por fazerem parte das minhas conquistas.

Ao meu esposo Ednei

Pela cumplicidade, amor, e companheirismo e por compartilhar comigo todos os meus momentos de alegria e tristeza sempre com humor e simpatia. Obrigado pela crença incondicional em todos os meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida

Pela disposição, ética e profissionalismo na orientação do trabalho e por compartilhar com seus alunos a vasta extensão dos seus conhecimentos.

À Universidade de São Paulo

Pela qualidade e solidez do ensino oferecido e por todos os avanços científicos e tecnológicos realizados em seu interior.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

Pelo financiamento do trabalho e por suas contribuições científicas à sociedade.

A toda minha família

Por todo incentivo, amizade e carinho e por todos os momentos de alegria proporcionados. Obrigado por sempre acreditarem em meus ideais.

Aos meus amigos de laboratório Marisa, Gisele, Lucas, Mariana, Fernanda Laus, Paula, Fernanda Takahama, Hugo, Edson, Roberto, Diana, Renata, Luciana, Fabiana, Camila, Gabriela, Marília e Dalmo

Pela ajuda em todos os momentos do trabalho, pela amizade e pela constante contribuição em minha aprendizagem.

A todos os meus amigos

Por estarem sempre presentes na minha vida, compartilhando os momentos de alegria e me amparando nos momentos de dificuldade.

BRAGA, N. N. Desnutrição protéica precoce prejudica memória de ratos testados em diferentes procedimentos de reconhecimento de objetos (*Rattus norvegicus*). Dissertação de Mestrado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 2010, 83f.

A desnutrição protéica precoce afeta as estruturas envolvidas nos mecanismos de comportamento, aprendizagem e memória. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de ratos desnutridos em diversos procedimentos de memória de reconhecimento de objetos. Ratos Wistar machos (n=132) foram submetidos a dietas isocalóricas contendo 6% (Desnutridos) ou 16% de proteína (Controle) durante os primeiros 49 dias de vida. Foi imposto um período de recuperação nutricional do dia 50 a 70 de vida, quando os testes comportamentais foram iniciados. No Experimento I os animais foram colocados em uma arena com um objeto A. Após 3 ou 24 horas desta exposição, o rato retornou para arena com o objeto A e outro objeto B. O Experimento II foi conduzido com três diferentes procedimentos. No primeiro, o animal foi colocado na arena com três objetos diferentes. Após 24 horas desta exposição, o animal foi novamente colocado na arena com dois objetos já conhecidos pelo animal e um novo objeto. No segundo procedimento, os animais foram colocados na arena com dois objetos localizados nos cantos adjacentes da arena. Após 24 horas o animal retornou para a arena com um objeto na mesma posição e o outro objeto no canto diagonal da arena. No terceiro procedimento o animal foi colocado em um contexto A com dois objetos idênticos. Após cinco minutos, o animal foi colocado em um contexto B com dois objetos idênticos, mas diferentes quando comparados aos objetos apresentados no contexto A. Durante a fase de teste, o animal foi colocado em um dos dois contextos com um objeto do contexto A e outro objeto do contexto B. Foi calculado o Índice de Reconhecimento: $IR = (\text{tempo gasto no novo objeto} / \text{tempo gasto no objeto já conhecido} + \text{tempo gasto no novo objeto}) \times 100$. Os dados foram submetidos ao Teste t Student para amostras independentes ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que os animais desnutridos apresentaram menores índices de reconhecimento quando comparados aos animais controle em todos os experimentos, sugerindo que a desnutrição protéica precoce prejudica a memória nos procedimentos de reconhecimento de objetos.

Palavras-chave: desnutrição, aprendizagem, memória de reconhecimento.

BRAGA, N. N. Early protein malnutrition affects memory of rats tested in several procedures of object recognition (*Rattus norvegicus*). Master Thesis – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 2010, 83f.

Early Postnatal protein malnutrition affects structures involved in the mechanisms of behavior, learning and memory. Thus, the aim of this work was to evaluate the performance of malnourished rats in several procedures of recognition memory for objects. Male Wistar rats (n=132) were submitted to isocaloric diets containing 6% (Malnourished) or 16% of protein (Control) during the first 49 days of life. A nutritional recovery period was imposed from 50 to 70 days of age, when behavioral tests started. In the Experiment I the animals were put in an open field with an object A. After 3 or 24 hours of this exposition, the rat returned in the open field with the object A and another object B. The Experiment II was conducted with three different procedures. In the first one, the animal was placed in the open field with three different objects. After 24 hours, the animal was replaced in the open field with two objects that were already known by the animal and a new object. In the second procedure the animals were placed in the open field with two objects located in the adjacent corners of the open field. After 24 hours the animal returned to the open field with an object in the same position and the other object in the diagonal corner of the open field. In the third procedure the animal was placed in a context A with two identical objects. After five minutes the animal was placed in a context B with two identical objects, but different when compared to the objects presented in the context A. During the test phase, the animal was placed in one of the two contexts with one object from the context A and another object from the context B. It was calculated the recognition index: $RI = (\text{time spent in the new object} / \text{time spent in the object already known} + \text{time spent in the new object}) \times 100$. The data were submitted to a Student's *t* test for independent samples ($p < 0.05$). The results showed that malnourished animals presented lower recognition indexes as compared with control animals in all the experiments, suggesting that early protein malnutrition impairs memory in procedures of object recognition.

Key-words: malnutrition, learning, recognition memory.

Figura 1.	Esquema do Experimento 1.....	44
Figura 2.	Animal durante a Fase de Habituação na arena vazia	45
Figura 3.	Esquema do Procedimento 1	46
Figura 4.	A: Fase de Aquisição B: Fase de Teste.....	47
Figura 5.	Esquema do Procedimento 2	48
Figura 6.	A: Fase de Aquisição B: Fase de Teste.....	48
Figura 7.	A: Animal em Fase de Habituação ao Contexto X B: Animal em Fase de Habituação ao Contexto Y	50
Figura 8.	Esquema do Procedimento 3	51
Figura 9.	Perda de peso corporal das ratas-mães (Média $\pm$ EPM) dos Grupos Controle e Desnutrido durante o período de lactação	53
Figura 10.	Peso das ninhadas Média $\pm$ EPM) dos Grupos Controle e Desnutrido durante o período de lactação.....	54
Figura 11.	A: Ninhada controle no dia do desmame (21 dias) B: Ninhada desnutrida no dia do desmame (21 dias).....	54
Figura 12.	Peso dos filhotes dos Grupos Controle e Desnutrido (Média $\pm$ EPM) durante o período de pós-lactação	55
Figura 13.	A: Animais controle e desnutrido uma semana após o desmame (28 dias) B: Animais controle e desnutrido ao início da recuperação nutricional (49 dias)	56
Figura 14.	A: Animais controle e desnutrido uma semana após o início da recuperação nutricional (56 dias) B: Animais controle e desnutrido no dia do início dos testes (70 dias).....	56
Figura 15.	Exploração do objeto A durante a fase de aquisição (Média $\pm$ EPM) dos Grupos Controle e Desnutrido	57
Figura 16.	Tempo de exploração do objeto A (Média $\pm$ EPM) ao longo dos dez minutos da fase de aquisição dos Grupos Controle e Desnutrido.....	58
Figura 17.	Índice de Reconhecimento dos Grupos Controle e Desnutrido (Média $\pm$ EPM) nos intervalos de três e 24 horas.....	58
Figura 18.	Número de levantamentos (rearings) dos Grupos Controle e Desnutrido (Média $\pm$ EPM) nos intervalos de três e 24 horas.....	59

Figura 19.	Número de quadrados cruzados pelos Grupos Controle e Desnutrido (Média $\pm$ EPM) nos intervalos de três e 24 horas	59
Figura 20.	Índice de Reconhecimento dos Grupos Controle e Desnutrido (Média $\pm$ EPM) no Procedimento 1 do Experimento 2.....	60
Figura 21.	Tempo de exploração do objeto novo (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido no Procedimento 1 do Experimento 2	61
Figura 22.	Tempo de exploração dos objetos C, D e F (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido	61
Figura 23.	Índice de Reconhecimento dos Grupos Controle e Desnutrido (Média $\pm$ EPM) no Procedimento 2 do Experimento 2.....	62
Figura 24.	Tempo de exploração do objeto em nova posição (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido no Procedimento 2 do Experimento 2	63
Figura 25.	Tempo de exploração dos objetos G1 e G2 (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido	63
Figura 26.	Índice de Reconhecimento dos Grupos Controle e Desnutrido (Média $\pm$ EPM) no Procedimento 3 do Experimento 2.....	64
Figura 27.	Tempo de exploração do objeto pertencente ao contexto diferente (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido do Procedimento 3 do Experimento 2	65
Figura 28.	Tempo de exploração dos objetos I1+H2 e I2+H1 (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido	65

Tabela 1.	Composição das dietas Controle e Hipoprotéica	42
------------------	---	----

Introdução

I. Desnutrição	21
II. Hipocampo: Desenvolvimento e consequências acarretadas pela desnutrição	23
III. Modelos animais de desnutrição	25
IV. Aprendizagem, memória e memória de reconhecimento.....	30

Objetivos

I. Objetivo Geral.....	39
II. Objetivos Específicos	39

Material e Método

I. Sujeitos.....	41
II. Composição das ninhadas	41
III. Alojamento.....	41
IV. Grupos nutricionais	42
V. Manutenção dos animais.....	42
VI. Método de eutanásia	43
VII. Experimento 1.....	43
VIII. Experimento 2.....	44
IX. Procedimento 1: Memória de cena complexa.....	45
X. Procedimento 2: Memória para localizações espaciais.....	47
XI. Procedimento 3: Memória de contexto	48
XII. Análise estatística	51

Resultados

I. Peso corporal	53
II. Dados comportamentais	57

Discussão 67**Conclusões** 75**Referências** 77

I. Desnutrição

A desnutrição é amplamente estudada por causar alterações em termos de desenvolvimento físico, além de prejudicar vários eventos maturacionais do cérebro, resultando em alterações que abrangem memória, comportamento e aprendizagem (MORGANE, MOKLER, GALLER, 2002). Trata-se de um problema global que afeta, sobretudo as camadas economicamente desfavorecidas da população. Mundialmente a desnutrição é a causa de 3,5 milhões de mortes entre mulheres em idade fértil e crianças abaixo dos cinco anos de idade; correspondendo ao índice de 35% dentre o total de mortes causadas por doenças em crianças com menos de cinco anos (BLACK et al, 2008). Esses índices são alarmantes, já que a desnutrição nos primeiros anos de vida ocasiona danos irreversíveis que são perpetuados até a vida adulta. Dentre as consequências da desnutrição nesta faixa etária pode-se citar o prejuízo no desenvolvimento físico como baixa estatura; redução do rendimento acadêmico que reflete diretamente nas condições de empregabilidade e renda na vida adulta; além de possuir consequências na geração seguinte que por sua vez possui maiores chances de nascimento com baixo peso (VICTORA, 2008).

No Brasil, apesar da redução significativa dos índices de desnutrição nas últimas décadas, ainda é grande o número de crianças em idade escolar que sofrem com o problema. Na década 1996-2006 ocorreu redução de 50% no índice de desnutrição que passou de 13,5% a 6,8% entre crianças menores de cinco anos (MONTEIRO et al, 2009). Entretanto, essa taxa ainda é elevada, tornando-se maior se forem analisadas as populações social e economicamente desfavorecidas como remanescentes quilombolas nos quais o índice de desnutrição é 76,1% maior do que a média na população nacional urbana (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL, 2007); as populações ribeirinhas do interior do estado do Amazonas nas quais se constatou que uma em cada três crianças é acometida por desnutrição (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL, 2006); além das populações

indígenas brasileiras que registram anualmente cerca de 46 mortes a cada mil nascimentos em crianças abaixo dos cinco anos por consequência da desnutrição (FUNASA, 2007).

A desnutrição pode ser definida como o estado patológico proveniente de nutrição inadequada devido à ingestão insuficiente de calorias e outros nutrientes; consumo excessivo de calorias e outros nutrientes, além de ingestão insuficiente de um ou mais nutrientes específicos como vitaminas e minerais. (GE, CHANG, 2001). Assim, faz-se importante salientar que a desnutrição pode caracterizar-se tanto pela quantidade de nutrientes ingeridos quanto pela qualidade destes (MORGANE, MOKLER, GALLER, 2002).

É reconhecido que uma nutrição adequada garante o funcionamento e manutenção dos sistemas corporais como um todo. Deste modo, a desnutrição afetaria de modo preponderante todo funcionamento corporal, podendo ter consequências irreversíveis mesmo após um período de recuperação nutricional. Entretanto, para que isso ocorra, fatores diversos devem ser analisados. O primeiro deles diz respeito ao tipo de desnutrição, o que se relaciona ao nutriente que está sendo ingerido de modo insuficiente. Dessa forma, diferentes domínios da função cognitiva podem ser afetados pelo tipo de deficiência nutricional a que o cérebro é exposto durante o desenvolvimento (GEORGIEFF, 2007; RANADE et al, 2008). Nesse sentido, a desnutrição protéica tem sido muito estudada por seus graves efeitos, já que o déficit na ingestão de proteína faz com que não sejam ingeridos os aminoácidos necessários para a síntese protéica estrutural, de enzimas, neuropeptídeos e neurotransmissores (GALLER, SHUMSKY, MORGANE, 1995; ALMEIDA, TONKISS, GALLER, 1996; RAFAEL, MORA, 1999; FEOLI et al, 2007; DIAZ-CINTRA et al, 2007; HERNÁNDEZ et al, 2008), além de causar prejuízos no desenvolvimento físico e metabólico (MIÑANA-SOLIS, ESCOBAR, 2008)

Fatores como a gravidade da desnutrição (leve, severa ou moderada) e sua duração (desnutrição por períodos longos ou curtos) também devem ser levados em conta quando se referem aos possíveis efeitos causados pela desnutrição.

Outro importante fator a ser analisado diz respeito ao período em que ocorreu a desnutrição. Dobbing (1968) sugeriu a hipótese do período crítico de desenvolvimento cerebral, segundo o qual existe uma época em que o cérebro passa por um rápido período de crescimento. Assim, a teoria propõe que durante essa fase todo o cérebro estaria mais vulnerável a influências externas como dieta inadequada, stress emocional e consumo de drogas por parte da mãe, entre outros fatores que podem comprometer o crescimento de determinadas regiões cerebrais (RICE, BARONE, 2000; KALIA, 2008). Dessa forma, a desnutrição ocorrida nesse período seria responsável por ocasionar efeitos em longo prazo. Em seres humanos, esse período se estende desde o terceiro mês de gestação até o segundo ano de vida, período no qual ocorre não somente um rápido crescimento cerebral, mas também os processos organizacionais precoces como a proliferação, migração e diferenciação celular, sinaptogênese e gliogênese cujas formações adequadas estão intimamente ligadas aos aminoácidos provenientes da dieta (MORGANE et al, 1993; RICE, BARONE, 2000).

II. Hipocampo: desenvolvimento e conseqüências acarretadas pela desnutrição.

O hipocampo constitui-se uma estrutura localizada no lobo medial temporal. Compreende o giro denteado, campos CA e o complexo subicular (LAVENEX, P. LAVENEX, P. B., AMARAL, 2007).

Trata-se de uma região amplamente estudada por sua importância na aquisição e consolidação da memória, exercendo um papel preponderante na formação de memórias e conseqüentemente na aprendizagem. Danos causados a essa região, principalmente no giro denteado, ocasiona profundos déficits na memória declarativa sem que ocorra dano motor e sensorial (LAVANEX, P.; LAVANEX, P. B.; AMARAL, 2007).

As características do hipocampo de mamíferos são semelhantes entre si, assim como o modo em que se dá seu desenvolvimento. Ele desenvolve-se a partir de uma ligeira curvatura existente no telencéfalo primitivo que, embora tenha seu desenvolvimento estendido até o

período pós-natal, caracteriza-se por ser uma das primeiras marcas reconhecíveis no córtex cerebral (BAYER, 1980b).

O hipocampo dos roedores possui seu desenvolvimento concentrado em grande parte no final do período pré-natal (principalmente entre os dias 18 e 22 da gestação, considerando que a duração da gestação estende-se durante 22 dias) e início da vida pós-natal (BAYER, 1980a). Estudos relatam que o hipocampo, e conseqüentemente suas sub-divisões, concentra 80% do total de seu crescimento durante as quatro primeiras semanas de vida após o nascimento (SCRIMSHAW, 1967; BAYER, ALTMAN, 1974; BAYER, 1980a, BAYER, 1980b). Embora a maior parte do desenvolvimento concentre-se neste período, estudos recentes demonstram que, ao contrário do que ocorre com a grande maioria das estruturas do sistema nervoso central, a neurogênese nessas estruturas é contínua, estendendo-se até a idade adulta (LEE, SON, 2009; IMAYOSHI et al, 2009).

O hipocampo constitui-se uma estrutura totalmente não desenvolvida quando observada no final do período gestacional (17 a 18 dias). Observa-se um amontoado de células que, neste período, estão iniciando seu processo de diferenciação para tornarem-se células piramidais e granulares (BAYER, ALTMAN, 1974). Ao nascimento, observa-se que a citogênese do hipocampo está completa. Nesta fase, inicia-se o processo de maturação das células, além dos processos de crescimento dendrítico e gliogênese. A expansão volumétrica da estrutura ocorre durante o período pós-natal e estende-se até a vida adulta (BAYER, ALTMAN, 1974).

No giro denteado, a morfologia possui características próximas do nível adulto ao final da quarta semana de vida pós-natal. O trabalho de Bayer e Altman (1974) demonstra que as células granulares na região atingem os índices de 20% de formação do dia quatro a sete de vida; 13% do dia oito a 11; 14% do dia 12 a 15 e 13% após os 16 dias de vida. No que diz respeito às células piramidais, a pesquisa estimou que 70% dessas células são formadas no

período pós-natal, com a grande maioria concentrando-se dos quatro aos 15 dias de vida (BAYER, ALTMAN, 1974).

Nos trabalhos desenvolvidos por Bayer (1980a e 1980b) mensurou-se o desenvolvimento do hipocampo através da manipulação de baixos níveis de radiação em ratos nos períodos pré e pós-natal. A análise dos dados obtidos demonstrou que dos dias 5 a 15 de vida pós-natal, os animais alcançavam o pico no número de células imaturas na região hipocampal. Aos nove dias de vida, observou-se a co-existência da mesma quantidade de células maduras e imaturas na região. A partir dos 15 dias de vida, houve prevalência das células maduras no total de células existentes.

Os dados a respeito do desenvolvimento do hipocampo elucidam o fato de que a maior parte da neurogênese dessas estruturas ocorre no período pós-natal. Diversos estudos demonstram que devido a esse rápido desenvolvimento, as estruturas que compõem a formação hipocampal estariam mais vulneráveis a influências externas, podendo ser afetadas no caso da ocorrência de algum insulto ambiental (GOULD, TANAPAT, 1999; LAVENEX, P., LAVENEX, P. B., AMARAL, 2006; CAYRE, CANOLL, GOLDMAN, 2009).

A desnutrição constitui-se um dos insultos ambientais que podem afetar o hipocampo durante seu desenvolvimento, fazendo com que a neurogênese e outros eventos como a gliogênese, mielinização e o desenvolvimento dendrítico do hipocampo sejam afetados de maneira irreversível, influenciando os comportamentos processados nesta estrutura (MORGANE et al, 1993, GALLER, SHUMSKY, MORGANE 1995; LUKOYANOV, ANDRADE, 2000; MORGANE, MOKLER, GALLER, 2002; LISTER et al, 2005; LISTER et al, 2006; HERNÁNDEZ et al, 2008).

III. Modelos animais de desnutrição

Para a realização de estudos envolvendo a desnutrição, é crescente o número de pesquisas que são desenvolvidas através do uso de modelos animais, já que eles permitem que

uma série de verificações sejam conduzidas, o que não seria passível de realização em humanos principalmente por questões éticas. É possível destacar inúmeras vantagens em trabalhos envolvendo modelos animais:

- Facilidade de controle de variáveis (GALLER, SHUMSKY, MORGANE, 1995);
- Desenvolvimento de estudos que envolvem função cerebral e comportamento concomitantemente (GALLER, SHUMSKY, MORGANE, 1995; MUMBY et al, 1995; LANGSTON, WOOD, 2009; CACERES et al, 2010; BROADBENT et al, 2010);
- Facilidade de indução da desnutrição (GALLER, SHUMSKY, MORGANE, 1995);
- Custo menor em relação a pesquisas com humanos (GALLER, SHUMSKY, MORGANE, 1995);
- Possibilidade de observar efeitos em longo prazo, já que o rápido ciclo reprodutivo dos animais permite que sejam observados efeitos nas sucessivas gerações (GALLER, SHUMSKY, MORGANE, 1995; MORGANE, MOKLER, GALLER, 2002);
- Semelhança entre os sistemas neuronais de ratos e humanos (BAYER, 1980b; IZQUIERDO, 2002).

Platt et al (1962, 1971) demonstraram, em estudos realizados com ratos nascidos de mães bem nutridas e alimentados com dieta hipoprotéica e isocalórica, que esses animais possuíam alterações histológicas e funcionais no sistema nervoso central. Através de eletroencefalogramas demonstrou-se diminuição da atividade rítmica cerebral. Também foram demonstradas mudanças histológicas nas células nervosas e neurogliais. Os animais também desenvolveram tremores espasmódicos nas patas dianteiras. Após a introdução da recuperação nutricional houve melhoria das condições clínicas, entretanto, os danos cerebrais mantiveram-se. O estudo demonstrou que, após o nascimento, quanto mais precoce inseria-se o insulto nutricional, quanto menor o valor da proteína da dieta e quanto mais longo era o

período de imposição da dieta deficiente, maior era a severidade dos danos cerebrais produzidos.

Em estudos realizados com ratos (GALLER, SHUMSKY, MORGANE 1995; MORGANE et al, 1993) constatou-se que a desnutrição afeta as estruturas cerebrais responsáveis por seu comportamento. O hipocampo, estrutura responsável pelos processos de memória e aprendizagem foi afetado, sofrendo perda na arborização dendrítica, contato sináptico e em seus sistemas de neurotransmissores colinérgico e GABAérgico, envolvidos nos processos de memória (GALLER, SHUMSKY, MORGANE, 1995).

Em outro estudo (DIAZ-CINTRA et al, 2007), através de análise histoquímica, encontrou-se que animais desnutridos tanto no período pré- quanto no período pós-natal apresentam menor número de células neuronais na região hipocampal, o que, segundo os autores, seria responsável por resultar em um comprometimento na capacidade de memória, observada através de testes comportamentais.

No trabalho desenvolvido por Miñana-Solis e Escobar (2008) demonstrou-se que a desnutrição induzida no período pós-natal, além das alterações produzidas no desenvolvimento físico de ratos, produz também alterações de cunho metabólico como intolerância à glicose e menor produção de insulina, demonstrando que o pâncreas está vulnerável a insultos nutricionais, já que o período em que a desnutrição foi induzida caracteriza-se por ajustes na organização funcional e anatômica deste órgão.

O trabalho desenvolvido por Ranade et al (2008) testou os efeitos de diferentes deficiências nutricionais no desempenho dos animais na tarefa do labirinto radial aquático. Além disso, foi avaliado se houve redução no volume do hipocampo induzida pela desnutrição. Foram testados animais com submetidos à desnutrição protéica, desnutrição calórica, além do grupo com redução na quantidade de ferro ingerido. As diferentes privações nutricionais foram induzidas durante o período de gestação e lactação dos animais, o que se constitui um período crítico para formação e desenvolvimento do hipocampo (RANADE, et

al, 2008). Os dados demonstraram que todos os grupos com algum tipo de privação nutricional tiveram seus desempenhos prejudicados na tarefa. O grupo submetido à desnutrição protéica foi o que obteve maior redução do volume do hipocampo, obtendo cerca de 60% de redução do hipocampo como um todo e 66% de redução do giro denteado e campo CA1 em comparação ao grupo controle o que poderia ter induzido o déficit na aprendizagem da tarefa.

Outro estudo conduzido por Feoli et al (2007), demonstrou que ratos expostos a desnutrição protéica durante a gestação e lactação apresentaram menor peso corporal e cerebral nos dias 2, 15 e 60 de vida comparados ao grupo controle.

A diminuição na quantidade de proteínas na dieta durante a idade adulta também acarreta déficits nos comportamentos dependentes da integridade do hipocampo. No estudo conduzido por Lukoyanov e Andrade (2000) foi analisado o comportamento de animais que ingeriram dieta deficiente em proteína dos dois aos seis meses de vida. Metade dos animais foi selecionada para receber dieta balanceada a partir dos cinco meses de idade a fim de configurar o grupo reabilitado nutricionalmente. Os testes foram iniciados aos seis meses de idade dos animais e consistiram na análise do comportamento dos animais no Campo Aberto, em um procedimento de Esquiva Passiva e na análise da aprendizagem espacial e memória medidas através do teste do Labirinto Aquático de Morris. Além disso, para analisar a relação entre mudanças neuroanatômicas e comportamentais induzidas pela desnutrição, foram feitas estimações estereológicas na formação hipocampal desses animais. Foi analisado o total de neurônios nas principais subdivisões do hipocampo (campos CA1 e CA3), além do número total de contatos sinápticos entre os axônios das células granulares e as excrescências dendríticas das células piramidais do campo CA3. Os dados demonstraram que os animais que receberam dieta restrita em proteína tiveram seu desempenho prejudicado no Labirinto Aquático de Morris, despendendo mais tempo na aprendizagem da tarefa. Além disso, os animais demonstraram maior índice de exploração no campo aberto, locomovendo-

se igualmente nas áreas internas e externas o que sugere que esses animais foram menos reativos à novidade do ambiente em comparação ao grupo controle. Os animais desnutridos tiveram também redução no número total de células granulares e neurônios piramidais nos campos CA1 e CA3. Dos resultados obtidos, merece destaque aqueles obtidos com os animais que foram reabilitados antes dos testes, já que esses não sofreram déficits nos experimentos, não diferindo dos resultados obtidos pelos animais controle (LUKOYANOV, ANDRADE, 2000). Dessa forma, salienta-se que os efeitos da desnutrição promovida após o período de desenvolvimento das estruturas responsáveis por memória e aprendizagem não se mostraram permanentes, mas sim associados apenas ao período em que se deu o episódio de desnutrição.

A partir do estudo acima mencionado, é possível dizer que a desnutrição protéica produz prejuízos permanentes quando ocorre durante um período crítico de desenvolvimento cerebral, sendo que quando ocorre na idade adulta, os efeitos estão apenas condicionados à duração da restrição protéica, podendo ser recuperados sem que haja dados permanentes.

A desnutrição protéica precoce, além de acarretar diversos prejuízos no desenvolvimento neurológico e conseqüentemente no comportamento e aprendizagem, ocasiona déficit no desenvolvimento físico de ratos, que tem seu ganho de peso reduzido severamente em comparação ao grupo que não sofreu restrição protéica (ALMEIDA, DE ARAÚJO, 2001; HERNANDES, et al, 2005; FRANÇOLIN-SILVA et al, 2006; FUKUDA et al, 2007).

Os estudos descritos demonstram que a desnutrição protéica imposta durante o período crítico de desenvolvimento cerebral produz alterações físicas e metabólicas, além de alterações cerebrais que levam a diversos prejuízos no que diz respeito ao comportamento, aprendizagem e memória.

IV. Aprendizagem, memória e memória de reconhecimento

A aprendizagem pode ser definida como uma mudança relativamente permanente no comportamento resultante de uma experiência (CATÂNIA, 1999). A memória corresponde ao processo pelo qual essas experiências levam à alteração do comportamento (HELENE, XAVIER, 2003). A importância da memória reside no fato de que ela proporciona a vantagem adaptativa da experiência prévia para a solução de questões inerentes à sobrevivência, além de ter um papel preponderante na capacidade de desempenhar atividades perceptomotoras geradas pelo registro de contingências espaciais e temporais entre estímulos e destes com suas respostas, além de abranger lembranças de estímulos familiares ou locais específicos do ambiente (HELENE, XAVIER, 2007).

Um sistema de memória é o modo com o cérebro processa as informações que estarão disponíveis para uso posteriormente. Dessa forma, alguns desses sistemas relacionam-se a lembranças explícitas que podem ser conscientemente evocadas (memória declarativa), enquanto outros sistemas direcionam-se a lembranças implícitas, ou seja, que não podem ser evocadas de modo consciente (memória não declarativa) (BUDSON, 2009). Assim, define-se como memória declarativa o conhecimento de que algo ocorreu. Ela subdivide-se em memória episódica que se refere a acontecimentos específicos e memória semântica que por sua vez se refere a aspectos gerais de um acontecimento (IZQUIERDO, 2002; BUDSON, 2009). Já a memória não-declarativa, também denominada memória de procedimento, refere-se ao saber como e inclui a capacidade de executar procedimentos motores (IZQUIERDO, 2002).

A memória episódica, isto é, a lembrança de episódios particulares, tem seu processamento dependente das estruturas pertencentes ao lobo temporal medial, sobretudo o hipocampo, cuja integridade está relacionada à capacidade de evocação de episódios que relacionam memória espacial e/ou não espacial. O próprio circuito pelo qual as informações chegam e saem do hipocampo corroboram com a idéia de que o hipocampo tem papel

fundamental no processamento de memórias espaciais e não espaciais. Em ratos, estudos anatômicos demonstram que a informação espacial chega ao hipocampo via córtex postrhinal e córtex medial entorhinal, enquanto as informações não espaciais chegam através do córtex perirhinal e córtex entorhinal lateral. Dessa forma, o hipocampo é idealmente situado a fim de combinar informações espaciais e não espaciais, atuando quando são evocadas memórias de itens, de suas localizações ou da associação entre ambos (MANNS, EICHENBAUM, 2009). Em concordância com esta idéia está o trabalho desenvolvido por O'Keefe e Nadel (1978), no qual foi proposta a idéia de que o hipocampo suporta um mapa cognitivo do mundo externo, sendo parte de um sistema de memória que contém informações sobre as localizações no ambiente do organismo, sua relação espacial e a existência de objetos específicos em localizações específicas.

Um dos exemplos de memória episódica amplamente estudado é a memória de reconhecimento que se caracteriza por ser um processo neural segundo o qual um sujeito está consciente de que um estímulo foi previamente encontrado, tornando o reconhecimento uma característica comportamental do processo (STECKLER et al, 1998; MANNS et al, 2003). Este tipo de memória requer que características específicas de um determinado evento sejam identificadas, discriminadas e comparadas com as memórias de características previamente vivenciadas (STECKLER et al, 1998).

A memória de reconhecimento abrange dois componentes: o primeiro deles constitui-se episódico, que consiste na habilidade de lembrar o episódio no qual um item foi encontrado. O segundo trata do componente familiar, isto é, a capacidade de se reconhecer um item como previamente encontrado, contudo sem reconhecer o episódio no qual se deu o encontro (MANNS et al, 2003). Dados recentes demonstram que o hipocampo suporta o componente episódico da memória de reconhecimento, pois sua função na memória está relacionada à dependência do contexto no qual se deu o encontro com determinado objeto (LANGSTON, WOOD, 2009).

O primeiro estudo que se propôs a medir a preferência espontânea de ratos em explorar elementos nunca vistos previamente data da década de 50, quando Berlyne (1950), encontrou que ratos despendem mais tempo explorando novos objetos do que objetos já conhecidos (BERLYNE, 1950). Ennaceur e Delacour, na década de 80, basearam-se nos achados de Berlyne, associando a preferência dos animais pela novidade à memória de reconhecimento (ENNACEUR, DELACOUR, 1988), pois essa preferência seria devida ao fato de que os objetos previamente encontrados foram memorizados pelos animais, e essa memória é evocada no momento do reconhecimento, fazendo com que os animais explorem mais os objetos nunca vistos anteriormente.

Esse tipo de procedimento possui inúmeras vantagens, dentre elas o fato de que não requer treino prévio, pode ser conduzido em sessões de curta duração, não requer exposição a estímulos aversivos, não requer privação de água ou alimento e utiliza aparatos simples como o campo aberto (BEVINS, BESHEER, 2006).

Diversos modelos de memória de reconhecimento foram estudados em animais a fim de medir e verificar as preferências espontâneas em ratos (DIX, AGGLETON, 1999; ENNACEUR et al, 2005; FERNANDES, 2005; FORWOOD et al, 2007; REGER, HOVDA, GIZA, 2009).

Em 1999, no trabalho desenvolvido por Dix e Aggleton (1999), além de conduzidos experimentos de discriminação entre objetos novos e objetos em localizações diferentes, também foi conduzido um estudo com o intuito de verificar se ratos possuem preferência em explorar objetos pertencentes a um contexto diferente daquele no qual o objeto foi previamente encontrado. Como conclusão, foi obtido que os animais despenderam mais tempo explorando objetos inseridos em contextos diferentes. No mesmo trabalho, foi analisada a mudança na preferência dos ratos em explorar objetos novos ao longo do experimento. Para tanto, as fases de teste dos experimentos possuíam três minutos e a exploração do animal foi analisada ao longo de cada minuto separadamente. Dessa forma,

encontrou-se que os animais despendem mais tempo explorando objetos novos ou em localizações e contextos novos ao longo dos dois primeiros minutos do que no terceiro minuto. Segundo os pesquisadores, isso sugere que os animais “aprendem” as características do objeto, localização ou contexto novo no início do teste, de modo com que esses elementos que antes constituíam novidades passam a ser familiares no final do procedimento.

No trabalho desenvolvido por Ennaceur et al (2005), foram conduzidos três experimentos com o intuito de avaliar a preferência de ratos em testes que envolvem discriminação de objetos novos e discriminação de objetos em localizações diferentes daquelas encontradas previamente. Através dos experimentos, foi concluído que os animais possuem preferência espontânea por objetos novos e por objetos em localizações diferentes daquelas previamente encontradas.

Bevins e Besheer (2006) realizaram uma revisão de diversos modelos que utilizam tarefas de memória de reconhecimento, concluindo que em todos os procedimentos revisados, ratos possuem uma tendência em interagir mais com objetos novos do que com objetos familiares.

Nos estudos desenvolvidos por Forwood et al (2007), constatou-se que ratos discriminam estímulos visuais novos daqueles já encontrados previamente, mesmo quando os estímulos utilizados referem-se ao uso de imagens bi-dimensionais para a discriminação.

O trabalho realizado por Reger, Hovda e Giza (2009) testou a preferência espontânea em ratos de diferentes idades (20-23 dias; 29-40 dias; acima dos 50 dias) a fim de verificar se a capacidade da memória de reconhecimento sofre modificações conforme ocorre o amadurecimento cerebral. Os testes ocorreram 15 min; 1; 24 ou 48 horas após a exposição do animal aos objetos durante a fase de aquisição. Após esses intervalos os animais foram novamente colocados na arena e seus índices de reconhecimento foram calculados baseados no tempo de exploração do objeto já conhecido e do objeto novo. Os resultados obtidos no

trabalho demonstraram que mesmo os animais jovens (20-23 dias) despendem mais tempo explorando o objeto novo, em comparação à exploração do objeto previamente encontrado.

Baseado nesses estudos que avaliaram a preferência dos animais em explorar elementos novos, trabalhos foram desenvolvidos a fim de verificar se o dano na região hipocampal pode afetar a memória de reconhecimento, já que o comprometimento do hipocampo, como uma estrutura responsável pelos processos de memória e aprendizagem, pode prejudicar o desempenho de animais nas tarefas que medem a memória de reconhecimento através da preferência espontânea (MUMBY et al, 1995; VNEK, ROTHBLAT, 1996; CLARK, ZOLA, SQUIRE, 2000; MUMBY et al, 2002; ERGORUL, EICHENBAUM, 2004; O'BRIEN et al, 2006; ROSSATO et al, 2007; GOOD et al, 2007; LANGSTON, WOOD, 2009; CACERES et al, 2010; BROADBENT et al, 2010).

O trabalho desenvolvido por Mumby et al (1995) analisou a performance de ratos em cinco tarefas de memória de reconhecimento após lesão bi-lateral do hipocampo. Os dados obtidos demonstraram que em todas as tarefas realizadas, os animais que sofreram lesões hipocampais tiveram diferentes padrões de déficits, o que elucida que as lesões prejudicaram os animais na retenção das informações inerentes ao objeto já conhecido, o que fez com que os animais lesionados despendessem o mesmo tempo na exploração dos objetos conhecidos e novos.

No estudo desenvolvido por Vnek e Rothblat (1996), animais com lesões do hipocampo dorsal foram testados e comparados a animais controle (Grupo Sham) em tarefas de discriminação visual. Os animais passaram pela fase de aquisição e somente após três semanas foram realizados os testes. O objetivo do experimento foi verificar se as lesões produziram déficits na retenção das informações referentes ao objeto após um longo período de intervalo. Os dados demonstraram que os animais lesionados tiveram desempenho inferior comparado aos animais do Grupo Sham na tarefa descrita.

O trabalho desenvolvido por Clark et al (2000) também demonstra que ratos submetidos a lesões hipocampais por radiofrequência tiveram sua performance comprometida em testes de reconhecimento de objetos. No referido estudo, foram testados animais em diferentes intervalos (10 segundos, 1 minuto, 10 minutos, 1 hora e 24 horas). Nos intervalos superiores a 1 hora, ratos com lesões hipocampais tiveram seu desempenho prejudicado na tarefa de reconhecimento de objetos.

Mumby et al (2002) verificou que lesões citotóxicas no hipocampo de ratos produziram déficits na memória de reconhecimento testada em três diferentes experimentos: memória para cenas complexas, localizações espaciais e contextos diferentes. Em todos os testes, os animais lesionados tiveram índices de reconhecimentos inferiores aqueles obtidos pelos animais que sofreram apenas o procedimento cirúrgico (não-lesionados).

O trabalho realizado por Ergorul e Eichenbaum (2004) estudou os efeitos de lesões hipocampais na memória de reconhecimento para pistas espaciais e odores em ratos. Os dados obtidos no trabalho demonstraram que os animais tiveram sua memória de reconhecimento prejudicada, pois não despenderam mais tempo na exploração da característica nova, explorando ambas as características igualmente, o que demonstra o papel crítico do hipocampo na memória de reconhecimento.

Em 2006, O'Brien et al realizou um experimento a fim de determinar os efeitos de lesões hipocampais realizadas através de injeções de NMDA bi-laterais no reconhecimento de objetos associados a um determinado contexto, ou seja, o fato do objeto ser novidade estava associado à sua localização em um contexto diferente daquele em que o animal o encontrou previamente. Foi observado que os animais lesionados tiveram sua performance prejudicada, já que não foram capazes de associar a novidade do objeto com o contexto no qual ele foi encontrado.

No trabalho de Rossato et al (2007), foi analisado se a infusão de um inibidor da síntese de proteínas no hipocampo prejudicaria ratos em procedimentos de memória de

reconhecimento, no que diz respeito à consolidação durante o intervalo entre a fase de aquisição e a fase de teste. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi verificar se o inibidor da síntese de proteína hipocampal prejudicaria o animal a reter as informações necessárias para o reconhecimento de objetos em diferentes tarefas. Foi concluído que o prejuízo na síntese protéica hipocampal durante a fase de retenção da tarefa (fase entre a aquisição e o teste) prejudicou os animais no que diz respeito à memória de reconhecimento, indicando, segundo os autores, o papel fundamental da integridade do hipocampo na estocagem da informação, ou seja, nos processos de memória.

O trabalho desenvolvido por Good et al (2007), propôs a análise de animais com lesões hipocampais provocadas através da injeção da toxina ácido ibotênico. Após 14 dias de recuperação da cirurgia, os animais foram expostos a testes de memória de reconhecimento a fim de verificar se a lesão hipocampal prejudicou os diferentes componentes da memória de reconhecimento. A análise histológica dos cérebros danificados demonstrou que houve um mínimo de 70% de perda celular na região hipocampal. O resultado indicou que a lesão hipocampal prejudicou os animais no que diz respeito à memória de reconhecimento de contexto, o que segundo os autores demonstra o envolvimento do hipocampo no componente episódico da memória de reconhecimento.

Langston e Wood (2009) desenvolveram um trabalho no qual foram avaliados os efeitos de lesões hipocampais realizadas através de injeções bi-laterais citotóxicas que incluíam o giro denteado e os campos CA1 e CA3. Os animais foram testados em um experimento de memória de reconhecimento no qual era necessário que o animal percebesse mudanças no contexto e na localização do objeto a fim de julgar se estes aspectos eram novidade ou não. Comparados aos animais que não sofreram lesão (Grupo Sham), os ratos lesionados não foram capazes de distinguir as mudanças ambientais dos objetos, tendo seu desempenho prejudicado na tarefa.

No trabalho desenvolvido por Caceres et al (2010) foram realizadas lesões hipocampais através da administração de radiação nos primeiros três dias de vida de ratos. Os animais foram testados após 30 dias e constatou-se que além das mudanças histológicas produzidas pela lesão do hipocampo, houve déficits comportamentais avaliados através do teste de esQUIVA inibitória e de memória de reconhecimento. Os animais que sofreram lesão hipocampal tiveram menor índice de reconhecimento em comparação ao grupo controle que sofreu apenas os procedimentos cirúrgicos.

Outro trabalho desenvolvido recentemente por Broadbent et al (2010), avaliou os efeitos de lesões bi-laterais do hipocampo na performance de ratos em um procedimento de memória de reconhecimento. Os animais passaram por 12 sessões de aquisição, quando exploraram um único objeto no campo aberto. Os grupos Lesão e Sham sofreram os procedimentos cirúrgicos um dia, quatro semanas ou 8 semanas após a última exposição da fase de aquisição. Os animais passaram pela fase de teste duas semanas após os procedimentos cirúrgicos. A análise dos dados revelou que os animais lesionados após um dia e quatro semanas do fim da fase de aquisição demonstraram déficits na memória de reconhecimento enquanto o grupo lesionado oito semanas após a fase de aquisição apresentou desempenho semelhante ao obtido pelo grupo sham. Segundo os autores, os dados revelam que depende da integridade do hipocampo que a consolidação da memória seja realizada de forma eficiente, já que os animais lesionados pouco tempo após a fase de aquisição tiveram performance inferior aquela obtida pelos animais que tiveram o tempo adequado para que a memória fosse consolidada.

É importante destacar o papel da fase de aquisição nos testes que envolvem memória de reconhecimento. Problemas ou a pouca exploração por parte dos animais durante esta fase poderiam ocasionar erros interpretativos a respeito da memória de reconhecimento, já que um déficit desse tipo nessa fase poderia constituir-se a causa das diferenças entre o índice de reconhecimento e não propriamente a memória de reconhecimento em si. Alguns trabalhos

(VNEK, ROTHBLAT, 1996; GASKIN et al, 2010) demonstram que entre os grupos lesionados e sham não foram encontradas diferenças na exploração do objeto durante a fase de aquisição o que significa que ambos os grupos despendem o mesmo tempo na exploração do objeto durante essa fase. Dessa forma, os déficits no índice de reconhecimento dos animais lesionados devem-se a problemas existentes na consolidação da memória de reconhecimento que não foi realizada adequadamente devido às lesões produzidas.

Como revisado anteriormente, existem diversos trabalhos que se propuseram a verificar como os danos hipocampais prejudicam processos de memória e aprendizagem. Levando em consideração o fato de que a desnutrição protéica precoce causa déficits no desenvolvimento do hipocampo, região responsável pela memória, é importante considerar que são necessárias pesquisas que se proponham a analisar o desempenho de animais desnutridos em testes que envolvem memória de reconhecimento, uma das funções atribuídas à região hipocampal.

I. Objetivo geral

- Analisar o desempenho de animais desnutridos em procedimentos que envolvem memória de reconhecimento de objetos em ratos.

II. Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos da desnutrição protéica precoce na memória de reconhecimento para objetos novos em ratos.
- Analisar os efeitos da desnutrição protéica precoce na memória de reconhecimento para cenas complexas em ratos.
- Analisar os efeitos da desnutrição protéica precoce na memória de reconhecimento espacial em ratos.
- Analisar os efeitos da desnutrição protéica precoce na memória de reconhecimento de contexto em ratos.

I. Sujeitos

Foram utilizados 132 ratos albinos machos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar provenientes do Biotério Central do *campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A metodologia do presente trabalho está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus da USP de Ribeirão Preto, Processo nº 08.1.135.53.3.

II. Composição das ninhadas

As ninhadas foram recebidas no dia de seu nascimento e alojadas no biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Foram compostas pela rata-mãe, seis filhotes machos e duas fêmeas, escolhidos aleatoriamente a fim de que sejam evitadas possíveis variáveis genéticas. Após esse procedimento, as ninhadas foram divididas de acordo com sua condição nutricional, recebendo dietas isocalóricas com 6% de proteína (ninhadas desnutridas) ou 16% de proteína (ninhadas controle).

III. Alojamento

Durante a fase de lactação (0 a 21 dias), as ninhadas permaneceram em caixas de polipropileno medindo 41X40X17 cm, com tampa gradeada de aço inoxidável, comedouro de aço inoxidável, bebedouro de vidro e forrada com raspas de madeira trocadas semanalmente. Aos 21 dias, foi realizado o desmame que constituiu na separação dos filhotes da rata-mãe, além da separação das fêmeas que não foram utilizadas no experimento a fim de que fossem evitadas possíveis variações referentes ao ciclo estral. Os machos foram agrupados em trio e permaneceram em caixas como acima mencionadas. Após o desmame as caixas foram limpas duas vezes por semana.

IV. Grupos Nutricionais

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a condição nutricional. O Grupo controle recebeu dieta balanceada com 16% de proteína enquanto o Grupo Desnutrido recebeu dieta balanceada com 6% de proteína. As dietas foram preparadas de acordo com Barnes *et al.* (1968), a partir de modificações descritas por Santucci *et al.* (1994). A composição das dietas está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição das dietas Controle e Hipoprotéica (em %):

COMPONENTES	CONTROLE	HIPOPROTÉICA
Proteína (Caseína)	16,0	6,0
Metionina	0.032	0.012
Gordura	8.0	8.0
Mistura Salina	5.0	5.0
Mistura Vitamínica	1.0	1.0
Colina	0.2	0.2
Amido	69,768	79,788
Total	100.0	100.0

FORNECEDORES: Caseína: SKF, Alemanha; Metionina: Dyets, USA; Gordura: Óleo de Milho (Mazola ® Refinarias de Milho Brasil); Carboidrato: Amido de Milho (Maizena ® Refinarias de Milho Brasil); Mistura Salina: Rhoster, Indústria e Comércio LTDA Brasil; Mistura Vitamínica: Rhoster, Indústria e Comércio LTDA, Brasil; Colina: Rhoster, Indústria e Comércio LTDA, Brasil.

V. Manutenção dos animais

Na fase de pós-lactação, os animais receberam as mesmas dietas do período de lactação de acordo com sua condição nutricional inicial (controle ou desnutrido) até os 49 dias de idade. A partir daí, todos os animais receberam dieta comercial para roedores (Nuvital Nutrientes Ltda. – Colombo, Paraná) até os 70 dias quando os testes serão iniciados.

A temperatura do biotério permaneceu controlada em 23° C (+/- 1) e os animais foram mantidos sob luz artificial em ciclo claro-escuro controlado em 12h, com as luzes sendo acesas às 6h. Todos os experimentos foram conduzidos na fase clara do ciclo sono-vigília.

Foram realizadas pesagens da rata-mãe e das ninhadas no período de lactação nos dias 0 (nascimento), 7, 14 e 21. No período de pós-lactação as pesagens foram realizadas com os animais individualmente, uma vez por semana até os 70 dias.

VI. Método de Eutanásia

Após todos os procedimentos experimentais os animais foram sacrificados por inalação de CO₂. Posteriormente, os animais seguiram até o Biotério Central para incineração.

VII. Experimento 1

Para o experimento 1 foram utilizados 78 animais. Foi utilizada uma arena quadrada de madeira, medindo 1mX1mX1m com piso dividido em nove quadrados iguais. O aparato permaneceu em uma sala livre de ruídos e com controle de iluminação. Os objetos utilizados para o reconhecimento consistiram em uma bolinha de gude (objeto A) e uma peça de dominó de plástico (objeto B) que foram limpos a cada tentativa com algodão embebido em álcool 30% a fim de que fossem eliminados possíveis odores. A arena também foi limpa a cada tentativa. Acima do aparato foi fixada uma câmera da marca Sony®, modelo Handcam, conectada a um sistema de vídeo e monitor da marca LG®, instalados em uma sala adjacente onde as imagens foram gravadas e analisadas posteriormente.

Durante três dias consecutivos os animais foram submetidos a sessões de habituação que consistiram na exploração da arena vazia durante 15 minutos diários.

Após o período de habituação, de acordo com o procedimento descrito por Dodart *et al* (1997), o animal foi colocado na arena na presença do objeto A para livre exploração

durante 10 minutos, o que consistiu a fase de aquisição. Os animais foram divididos em grupos de dois intervalos (três e 24 horas), isto é, após o intervalo estabelecido, o animal explorou a arena na presença de ambos os objetos (A e B), o que consistiu a fase de teste (Figura 1). Foram medidos os tempo de exploração de cada objeto a fim de verificar se a exploração do objeto B foi maior que a do objeto A através da fórmula: $(\text{tempo B} / \text{tempo A} + \text{B}) \times 100$. Foi considerado exploração quando o animal aproximou-se dos objetos a uma distância menor ou igual a cinco centímetros.

A fim de descartar a hipótese de que diferenças no índice de reconhecimento entre os grupos fossem devidas a déficits na exploração do objeto durante a fase de aquisição, foi analisado quanto tempo cada animal explora o objeto A nesta fase e feita a comparação entre os grupos. Além disso, a fim de verificar a evolução da exploração do objeto A ao longo do teste foi feita a análise minuto a minuto da exploração do referido objeto pelo animal.

Com a finalidade de verificar a atividade exploratória e locomotora do animal foram analisados, também, o número de levantamentos (*rearings*) que ocorrem quando o animal apóia-se nas patas traseiras; e o número de quadrados cruzados pelo animal.

Figura 1: Esquema do Experimento 1

VIII. Experimento 2

No experimento 2 foram utilizados 54 animais. Antes de ser iniciado o experimento, os animais passaram por um período de habituação que consistiu na exploração da arena

vazia por três dias consecutivos durante 15 minutos por dia (Figura 2). No referido experimento foram realizados três procedimentos.

Figura 2: Animal durante a fase de habituação na arena vazia.

IX. Procedimento 1 – Memória de cena complexa

O procedimento 1 foi iniciado no primeiro dia que sucede a habituação (animais com 73 dias). Este procedimento foi realizado de acordo com o descrito por Palchykova *et al* (2006).

Para esse procedimento foi utilizada a arena de madeira medindo 1mX1mX1m, colocada em uma sala com controle de iluminação e ruídos. Foram utilizados para o reconhecimento uma bolinha de plástico (objeto C), um cone de plástico (objeto D), uma xícara de cerâmica (objeto E) e um cubo de plástico (objeto F). Os objetos foram limpos a cada tentativa com algodão embebido em álcool 30% a fim de eliminar possíveis odores. Esse procedimento consistiu em duas fases. Na primeira delas, a fase de aquisição, os animais foram expostos a arena contendo três objetos (objetos C, D e E) durante cinco tempos de cinco minutos com 15 minutos de intervalo entre as exposições. Após um intervalo de 24 horas ocorreu a fase de teste na qual os animais foram novamente expostos à arena durante

cinco minutos, e esta, por sua vez, continha dois objetos previamente explorados e um objeto totalmente novo (objeto F) (Figuras 3 e 4A, 4B).

O procedimento foi analisado através de uma câmera da marca Sony® modelo Handcam, instalada acima da arena e conectada a um sistema de vídeo e monitor da marca LG® instalados em uma sala adjacente.

Foi calculado o índice de reconhecimento (IR2) que consistiu no tempo de exploração do novo objeto dividido pelo tempo gasto na exploração no novo objeto mais o tempo de exploração dos objetos familiares multiplicado por 100. O IR2 pode ser expresso através da fórmula: $IR2 = \left[\frac{\text{tempo F}}{\text{tempo F} + \text{tempo (C + D)}} \right] \times 100$. Os dados obtidos através do cálculo do IR2 foram analisados estatisticamente pelo *Teste t* de estudos para amostras independentes ($p < 0,05$). Foi considerada exploração quando o animal se aproximou dos objetos a uma distância menor ou igual a cinco centímetros. Também foi analisada a mudança na preferência dos animais pelos objetos ao longo do teste considerando a exploração do objeto novo minuto a minuto e de todos os objetos minuto a minuto. Para análise estatística da preferência minuto a minuto foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) dos fatores dieta e minuto com medida repetida no fator minuto ($p < 0,01$).

Figura 3: Esquema do Procedimento 1 (Experimento 2). *A fase de aquisição consiste em cinco exposições de cinco minutos cada com 15 minutos de intervalo entre as exposições.

Figura 4A: Fase de aquisição

Figura 4B: Fase de teste

X. Procedimento 2: Memória para localizações espaciais

O procedimento 2 foi iniciado três semanas após o procedimento 1 (animais com 95 dias). Este procedimento foi realizado de acordo com o descrito por Palchykova *et al* (2006).

Nesse procedimento foi utilizada a arena de madeira medindo 1mX1mX1m colocada em uma sala com controle de iluminação e ruídos. Foram utilizados dois novos objetos que consistiram em duas peças de Lego® de plástico (G1 e G2). A higiene dos objetos e da arena constituiu-se a mesma mencionada anteriormente. Na fase de aquisição, os animais foram expostos a arena contendo os dois objetos dispostos nos cantos adjacentes superiores da arena durante cinco tempos de cinco minutos com 15 minutos de intervalo entre as exposições. Após um intervalo de 24 horas, houve a fase de teste na qual os animais foram novamente expostos à arena, com um dos objetos (objeto G1) na posição original e o outro (objeto G2) em uma posição diferente, ou seja, o objeto novo esteve localizado diagonalmente ao objeto já explorado (Figuras 5, 6A e 6B). O procedimento foi analisado através dos equipamentos acima descritos.

Foi calculado o índice de reconhecimento espacial (IRS) que consistiu no tempo de exploração do objeto em localização diferente dividido pelo tempo gasto na exploração do objeto em localização diferente mais o tempo de exploração do objeto em localização familiar multiplicado por 100. O IRS pode ser expresso através da fórmula: $IRS = (\text{tempo G2} / \text{tempo G2} + \text{tempo G1}) \times 100$. Os dados obtidos através do cálculo do IRS foram analisados

estatisticamente pelo *Teste t* de estudos para amostras independentes ($p < 0,05$). Também foi analisada a mudança na preferência dos animais pelos objetos ao longo do teste considerando a exploração do objeto novo minuto a minuto e de todos os objetos minuto a minuto. Para análise estatística da preferência minuto a minuto foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) dos fatores dieta e minuto com medida repetida no fator minuto ($p < 0,01$).

Figura 5: Esquema do Procedimento 2 (Experimento 2). * A fase de aquisição consiste em cinco exposições de cinco minutos cada com 15 minutos de intervalo entre as exposições.

Figura 6A – Fase de aquisição

Figura 6B – Fase de teste

XI. Procedimento 3 – Memória de contexto

O procedimento 3 foi iniciado três semanas após o procedimento 2 (animais com 116 dias). Este procedimento foi realizado de acordo com o descrito por Mumby *et al* (2002).

Foram utilizados dois ambientes diferenciados através de pistas possíveis de serem identificadas pelos animais, constituindo-se, dessa forma, dois contextos diferentes. No ambiente X, foi utilizada a arena quadrada de madeira medindo 1mX1mX1m, com paredes listradas de preto e branco e com chão forrado por uma chapa de aço. Nesse ambiente a iluminação foi de 100 lux. No ambiente Y, foi inserido um campo aberto redondo com base de madeira medindo 60 cm de diâmetro e paredes de acrílico pintadas de cinza medindo 50 cm de altura. O chão da arena foi forrado com raspas de madeira e a sala na qual a arena permaneceu foi iluminada com uma intensidade de 30 lux. Em ambas as salas houve controle de ruídos.

Foram utilizados dois pares de objetos, sendo os objetos que compõem um mesmo par idênticos. Esses objetos consistiram em um par de triângulos confeccionados com borracha (objetos H1 e H2) e um par de latas de refrigerante vazias (objetos I1 e I2). Os objetos, assim como a chapa de aço e as paredes das duas arenas foram limpos a cada tentativa. As raspas de madeira do campo aberto também foram trocadas a cada tentativa. As salas foram monitoradas através de dois equipamentos como os descritos anteriormente com as imagens gravadas para análise posterior.

Antes do teste, os animais passaram por nova fase de habituação, já que esse procedimento realizou-se em ambientes diferentes daqueles já conhecidos pelo animal. Dessa forma, os animais foram submetidos a três sessões diárias de habituação de cinco minutos cada nos ambientes X e Y sem a presença dos objetos (Figuras 7A e 7B).

No procedimento houve duas fases de aquisição e uma de teste. Na Fase de aquisição 1, o animal foi exposto ao ambiente X durante cinco minutos na presença dos objetos H1 e H2. Após um intervalo de cinco minutos houve a fase de aquisição 2, na qual o animal foi exposto ao ambiente Y na presença dos objetos I1 e I2. Com um intervalo de cinco minutos dessa última fase de aquisição, o animal foi exposto a um dos ambientes (X ou Y) na presença

de um dos objetos pertencentes aquele contexto e um objeto proveniente do contexto diferente (Figura 8). A fase de teste foi contrabalanceada entre os ambientes X e Y.

Foi calculado o índice de reconhecimento de contexto (IRC), através do tempo de exploração do objeto em contexto diferente dividido pelo tempo gasto na exploração do objeto em contexto diferente mais o tempo de exploração do objeto em contexto familiar multiplicado por 100. O IRC pode ser expresso através das fórmulas: $IRC\ X = (\text{tempo } I2 / \text{tempo } I2 + H1) \times 100$ (para identificação do objeto estranho ao contexto X) ou $IRC\ Y = (\text{tempo } H2 / \text{tempo } H2 + I1) \times 100$ (para identificação do objeto estranho ao contexto Y). Os dados obtidos através do cálculo do IRC foram analisados estatisticamente pelo *Teste t* de estudos para amostras independentes ($p < 0,05$). Também foi analisada a mudança na preferência dos animais pelos objetos ao longo do teste considerando a exploração do objeto estranho ao contexto minuto a minuto e de ambos os objetos minuto a minuto. Para análise estatística da preferência minuto a minuto foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) dos fatores dieta e minuto com medida repetida no fator minuto, seguida, quando apropriado, pelo teste *Post-hoc* de *Newman-Keuls* ($p < 0,01$).

Figura 7A: Animal em fase de habituação ao contexto X

Figura 7B: Animal em fase de habituação ao contexto Y

Figura 8: Esquema do Procedimento 3 (Experimento 2).

XII. Análise estatística

Os dados de peso dos animais foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores (dieta e dias) seguida, quando apropriado, pelo teste *Post-hoc* de *Newman-Keuls* ($p < 0,001$).

As gravações dos testes foram analisadas pelo Programa X-Plot Rat 2005. Os dados comportamentais referentes ao índice de reconhecimento (Experimentos 1 e 2), exploração do objeto na fase de aquisição, quadrados cruzados e rearings (Experimento 1) foram analisados estatisticamente pelo *Teste t* de Student para amostras independentes ($p < 0,05$).

Nas análises minutos a minuto da preferência dos animais pelos objetos, utilizou-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) dos fatores dieta e minuto com medida repetida no fator minuto, seguido, quando apropriado, pelo teste *Post-hoc* de *Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

I. Peso corporal

Os dados relativos ao peso das ratas-mãe demonstraram haver uma perda de peso significativamente maior das ratas desnutridas em relação às ratas controle (Figura 9). A ANOVA revelou efeito dos fatores dieta [$F(1,10) = 63.52$; $p < 0,001$], dia [$F(2,68) = 14.99$; $p < 0,001$] e da interação dos fatores dieta x dia [$F(2,68) = 17.6$; $p < 0,001$]. A análise das comparações múltiplas revelou uma diferença significativa entre as perdas de peso das ratas desnutridas e controles durante a primeira e segunda semana da lactação. Na terceira semana, a diferença da perda de peso das ratas controle e desnutridas não se mostrou significativa. Entre as ratas desnutridas, não há diferença significativa de perda de peso entre a primeira e segunda semana de lactação, entretanto, essa diferença aparece entre a segunda e terceira semana ($p < 0,05$). Entre as ratas controles, não há diferença significativa de redução de peso entre as semanas.

Figura 9 – Perda de peso corporal das ratas-mãe (Média ± EPM) dos Grupos Controle e Desnutrido durante o período de lactação.

No que se refere ao peso das ninhadas, houve uma diferença de peso corporal dos animais controle e desnutridos (Figuras 10 e 11). A análise estatística mostrou um efeito significativo do fator dieta [$F(1,9) = 140.9$; $p < 0,001$] e do fator dia [$F(3,27) = 542.3$;

$p < 0,001$], além da interação dos fatores dieta x dia [$F(3,27) = 156.3$; $p < 0,001$]. Pela análise de comparações múltiplas, observa-se que as ninhadas desnutridas pesaram significativamente menos que as ninhadas controle nos dias 7, 14, 21 ($p < 0,05$), sendo que no dia 0 (nascimento), não houve diferença entre o peso das ninhadas controle e desnutrida.

Figura 10 – Peso das ninhadas (Média $\pm$ EPM) dos Grupos Controle e Desnutrido durante o período de lactação. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, no mesmo dia, de acordo com o teste de Newman – Keuls.

Figura 11: A – Ninhada controle no dia do desmame (21 dias).
B – Ninhada desnutrida no dia do desmame (21 dias).

Os resultados demonstraram que os animais desnutridos mantêm menores pesos em relação aos animais controles nas quatro semanas que seguem ao desmame e nas semanas após ser iniciada a recuperação nutricional com dieta comercial (Figuras 12, 13 e 14). A análise estatística demonstrou efeito do fator dieta [$F(1,60) = 1012.9$; $p < 0,001$] e do fator dia [$F(6,360) = 2913.1$; $p < 0,001$]. Também houve efeito significativo da interação dos fatores dieta x dia [$F(6,360) = 389.2$; $p < 0,001$]. A análise das comparações múltiplas mostrou que a diferença de peso corporal entre os dois grupos se manteve desde os 28 dias (fase pós-desmame), incluindo os dias de recuperação nutricional (49 aos 70 dias) $p < 0,05$.

Figura 12 – Peso dos filhotes dos Grupos Controle e Desnutrido (Média $\pm$ EPM) durante o período de pós-lactação. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, no mesmo dia, de acordo com o teste de Newman – Keuls. A partir do dia 49, observa-se maior ganho de peso dos ratos desnutridos devido ao início da recuperação nutricional com dieta comercial.

Figura 13: **A** – Animais controle e desnutrido uma semana após o desmame (28 dias).
B – Animais controle e desnutrido ao início da recuperação nutricional (49 dias).

Figura 14: **A** - Animais controle e desnutrido uma semana após o início da recuperação nutricional (56 dias). **B** - Animais controle e desnutrido no dia do início dos testes (70 dias).

II. Dados comportamentais

Experimento 1

Os dados referentes à exploração do objeto A na fase de aquisição revelam que não houve diferença estatística entre animais desnutridos e controles. Dessa forma, pode-se dizer que ambos os grupos demonstram exploração semelhante durante a fase de aquisição (Figura 15). A análise minuto a minuto revelou não haver efeito do fator dieta, o que demonstra que animais controles e desnutridos não diferiram entre si. Entretanto houve efeito do fator minuto [$F(9,648) = 8.51$; $p < 0,001$], revelando um decréscimo de exploração do objeto A ao longo dos dez minutos em que os animais permaneceram na arena durante a fase de aquisição (Figura 16). Não houve efeito de interação dos fatores dieta X minutos.

Figura 15 – Exploração do objeto A (Média ±EPM) durante a fase de aquisição dos Grupos Controle e Desnutrido.

Figura 16 – Tempo de exploração do objeto A (Média $\pm$ EPM) ao longo dos dez minutos da fase de aquisição dos Grupos Controle e Desnutrido.

Os dados referentes à fase de teste demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre o índice de reconhecimento dos animais controle e desnutridos testados no intervalo de três horas $t_{(38)} = 2,87$; $p < 0,05$ e 24 horas $t_{(36)} = 2,34$; $p < 0,05$. Esses dados demonstram que os animais controle têm o índice de reconhecimento de objetos maior quando comparados aos animais desnutridos (Figura 17).

Figura 17 – Índice de reconhecimento dos Grupos Controle e Desnutrido (Média $\pm$ EPM) nos intervalos de três e 24 horas. * $p < 0,05$.

Não houve diferenças significativas entre o grupo controle e desnutrido quanto à atividade exploratória e locomotora que foi observada através do número de levantamentos (rearings) e quadrados cruzados (Figuras 18 e 19).

Figura 18 – Número de levantamentos (rearings) dos Grupos Controle e Desnutrido (Média $\pm$ EPM) em intervalos de três e 24 horas.

Figura 19 – Número de quadrados cruzados pelos Grupos Controle e Desnutridos (Média $\pm$ EPM) nos intervalos de três e 24 horas.

Experimento 2

Procedimento 1 – Memória de cena complexa

Os dados referentes ao índice de reconhecimento (IR2) demonstram diferença significativa entre animais controles e desnutridos $t_{(56)}=2.78$; $p<0,05$. Dessa forma, os dados explicitam que animais controle possuem índice de reconhecimento significativamente maior quando comparados aos animais desnutridos (Figura 20).

Figura 20 – Índice de reconhecimento dos Grupos Controle e Desnutrido (Média ±EPM) no Procedimento 1 do Experimento 2. * $p<0,05$.

A análise minuto a minuto revelou que com relação à exploração do objeto novo não houve efeito do fator dieta, o que indica que animais controle e desnutridos não diferiram entre si. Entretanto houve efeito do fator minuto [$F(4,224) = 6.77$; $p<0,001$], indicando um decréscimo de exploração do objeto novo ao longo dos cinco minutos de teste. Não houve efeito de interação dos fatores dieta X minuto (Figura 21).

Figura 21 – Tempo de exploração do objeto novo (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido no Procedimento 1 do Experimento 2.

Com relação à exploração dos objetos em geral (soma dos tempos de exploração dos objetos C, D e F), não houve efeito do fator dieta, entretanto, houve efeito do fator minuto [$F(4,224) = 7.95$; $p < 0,001$]. A análise indica que houve um decréscimo no tempo de exploração de todos os objetos ao longo dos cinco minutos de teste, entretanto, não houve diferença entre animais controle e desnutridos (Figura 22). Não houve efeito de interação dos fatores dieta X minutos.

Figura 22 – Tempo de exploração dos objetos C, D e F (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido.

Procedimento 2 – Memória para localizações espaciais.

A análise do índice de reconhecimento espacial (IRS) indica diferença significativa entre animais controle e desnutridos $t_{(58)} = 2.67$; $p < 0,05$, demonstrando que os animais controle possuem índice de reconhecimento maior quando comparados aos animais desnutridos (Figura 23).

Figura 23 – Índice de reconhecimento dos Grupos Controle e Desnutrido (Média ± EPM) no Procedimento 2 do Experimento 2. * $p < 0,05$).

No que se refere à análise da exploração minuto a minuto do objeto localizado em posição nova, não houve efeito do fator dieta, o que indica que animais controle e desnutridos não diferiram entre si com relação à exploração. Houve efeito do fator minuto [$F(4,232) = 4.02$; $p < 0,001$] o que revelou um decréscimo com relação à exploração ao longo dos cinco minutos de teste. Não houve efeito de interação dos fatores dieta X minuto (Figura 24).

Figura 24 - Tempo de exploração do objeto em nova posição (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido no Procedimento 2 do Experimento 2.

Com relação à exploração dos objetos na posição conhecida e nova (soma do tempo de exploração dos objetos G1 e G2), não houve efeito do fator dieta, contudo foi observado efeito do fator minuto [$F(4,232) = 7.11$; $p < 0,001$], já que houve diminuição de exploração dos objetos de um modo geral ao longo dos cinco minutos de teste. Não houve efeito de interação dos fatores dieta X minuto (Figura 25).

Figura 25 – Tempo de exploração dos objetos G1 e G2 (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido.

Procedimento 3 – Memória de contexto

A análise do índice de reconhecimento de contexto (IRC) revelou diferença significativa entre animais controle e desnutrido $t_{(51)} = 3.18$; $p < 0,05$. Isso indica que animais controle reconheceram mais eficientemente um objeto como sendo ou não pertencente a um contexto específico (Figura 26).

Figura 26 – Índice de reconhecimento dos Grupos Controle e Desnutrido (Média $\pm$ EPM) no Procedimento 3 do Experimento 2. * $p < 0,05$).

No que diz respeito à exploração minuto a minuto do objeto não pertencente ao contexto, não houve efeito do fator dieta, o que significa que animais controle e desnutridos não diferiram entre si. Houve efeito do fator minuto [$F(4, 204) = 23.68$; $p < 0,001$], demonstrando o decréscimo no tempo de exploração do objeto pertencente ao contexto diferente ao longo dos cinco minutos de teste. Não houve efeito de interação dos fatores dieta X minuto (Figura 27).

Figura 27 - Tempo de exploração do objeto pertencente ao contexto diferente (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido no Procedimento 3 do Experimento 2.

Quanto à exploração dos objetos de um modo geral [soma dos tempos de exploração dos objetos I1 e H2 (contexto X) assim como dos objetos I2 e H1 (contexto Y)], não houve efeito do fator dieta, contudo foi observado efeito do fator minuto [$F(4,204) = 16.73$; $p < 0,001$], pois houve um decréscimo no tempo de exploração dos objetos ao longo dos cinco minutos de teste. Não houve efeito de interação dos fatores dieta X minuto (Figura 28).

Figura 28 - Tempo de exploração dos objetos I1 + H2 e I2 + H1 (Média $\pm$ EPM) ao longo dos cinco minutos de teste dos Grupos Controle e Desnutrido.

A avaliação da perda de peso corporal das ratas-mãe confirma os efeitos produzidos pelo tratamento nutricional utilizado, visto que as ratas-mãe dos grupos controles e desnutridos estavam sob a mesma condição nutricional no início do experimento. Os dados relativos ao peso das ratas-mãe indicam que, enquanto as ratas desnutridas apresentaram significativa perda de peso ao longo da lactação, as ratas controles mantiveram a média de peso constante. Essa perda foi mais acentuada durante a primeira semana e sofreu uma diminuição nas demais. O período de amamentação demanda um alto gasto energético causado pelos cuidados com os filhotes e com a produção do leite (CAMBRAIA et al, 1997). Dessa forma, o gasto energético, combinado com a ingestão de dieta deficiente em proteína, que não supre a necessidade de reposição de nutrientes fez com que as ratas desnutridas sofressem uma acentuada perda de peso logo na primeira semana de aleitamento. Esse fato não ocorreu com as ratas controles que também tiveram gastos energéticos, porém estes gastos foram supridos pela ingestão de uma dieta com qualidade nutricional adequada.

Os dados relativos ao peso das ratas-mães obtidos no presente trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por Prestes-Carneiro et al (2006). Em seu trabalho, as ratas-mães foram alimentadas com dieta hipoprotéica contendo 9,5% de proteína e, embora as ratas tenham consumido mais proteína em comparação às ratas deste estudo, elas demonstraram uma acentuada redução do peso corporal em comparação às ratas do grupo controle.

Na terceira semana, a perda de peso das ratas de ambos os grupos foi estatisticamente semelhante. Esse fato poderia ser atribuído à menor necessidade de cuidado com os filhotes nessa idade, e de aleitamento, visto que esses já estariam alimentando-se com a dieta disponível na gaiola.

O peso das ninhadas desnutridas apresentou-se menor se comparado ao peso das ninhadas controles. Tal fato poderia ser explicado pela redução da quantidade de proteína ingerida pela rata-mãe afetando a qualidade do leite disponível aos filhotes, visto que haveria

uma diminuição dos aminoácidos necessários ao crescimento desses animais (PASSOS et al, 2000). Outro fator a ser considerado também seria a redução da quantidade de leite causada pela deficiência de proteína, o que combinado com a baixa qualidade influenciaria de modo preponderante o crescimento dos animais (PASSOS et al, 2000).

Diversos trabalhos existentes na literatura demonstram que um insulto nutricional produzido pelo déficit de proteína na dieta da rata-mãe influencia de modo preponderante o desenvolvimento físico dos filhotes, que possuem menor ganho de peso comparado aos filhotes do grupo controle (LEVITSKY, BARNES, 1972; ALMEIDA, DE ARAÚJO, 2001; LOBE, BERNSTEIN, GERMAN, 2006; PRESTES-CARNEIRO et al, 2006; FEOLI et al, 2007; MIÑANA-SOLIS, ESCOBAR, 2008). Os dados obtidos nestes trabalhos corroboram com os resultados aqui discutidos, demonstrando os efeitos deletérios da desnutrição protéica precoce no desenvolvimento físico dos animais.

Essa diferença no peso dos animais desnutridos em relação aos animais controle perpetuou-se até a idade adulta. Mesmo após um período de recuperação nutricional, os ratos desnutridos apesar de aumentarem o peso corporal, não atingem a média de peso obtida pelos ratos controle. De acordo com Passos et al (2000), essa diferença de pesos até a idade adulta pode ser explicada pelo fato de que o peso corporal dos animais adultos é determinado durante os períodos de gestação e lactação, isto é, o peso dos animais adultos depende das condições nutricionais existentes durante os períodos acima determinados.

Dessa forma, é importante salientar que a desnutrição introduzida em um período crítico ocasionou danos permanentes no desenvolvimento físico dos animais, já que mesmo após o período de recuperação nutricional esses animais não atingiram os pesos dos animais controles. Esses dados estão de acordo com aqueles obtidos por Prestes-Carneiro et al (2006), que demonstrou que ratos que foram sujeitos à desnutrição durante a lactação não foram capazes de atingir o nível de peso dos animais do grupo controle mesmo após o período de recuperação nutricional que perdurou do desmame até os 80 dias.

A desnutrição protéica precoce, além das alterações no peso corporal pode produzir alterações em longo prazo em termos estruturais, neuroquímicos, fisiológicos e comportamentais. Essas alterações podem atingir sistemas cerebrais que desempenham papel fundamental nos processos de memória e aprendizagem (MORGANE et al, 1993; GALLER, SHUMSKY, MORGANE, 1995; LUKOYANOV, ANDRADE, 2000; MORGANE, MOKLER, GALLER, 2002; LISTER et al 2005; LISTER et al 2006; HERNÁNDEZ, 2008) tais como o sistema hipocampal. Dados encontrados na literatura indicam que a integridade desse sistema é crucial na retenção de certos tipos de informações, inclusive as que se remetem a memória de reconhecimento (MUMBY et al, 1995; VNEK, ROTHBLAT, 1996; CLARK, ZOLA, SQUIRE, 2000; MUMBY et al, 2002; ERGORUL, EICHENBAUM, 2004; O'BRIEN et al, 2006; ROSSATO et al, 2007; GOOD et al, 2007; LANGSTON, WOOD, 2009; CACERES et al, 2010; BROADBENT et al, 2010).

Alguns trabalhos na literatura confirmam a relação entre a integridade do sistema hipocampal e memória de reconhecimento. No trabalho desenvolvido por Dodart et al (1997), animais foram submetidos ao efeito da escopolamina –um antagonista colinérgico. Os resultados indicaram um desempenho prejudicado na tarefa de memória de reconhecimento de objetos em uma arena quadrada. Esses dados estão em concordância com os dados obtidos neste presente trabalho, já que a administração de escopolamina induziu os animais a um déficit em termos de memória, déficit este que também pode ser observado em animais submetidos à desnutrição em seu período de desenvolvimento cerebral.

O trabalho desenvolvido por Clark et al (2000) também demonstra que ratos submetidos a lesões hipocâmpais por radiofrequência tiveram sua performance comprometida em testes de reconhecimento de objetos. No referido estudo, foram testados animais em diferentes intervalos (10 segundos, 1 minuto, 10 minutos, 1 hora e 24 horas). Nos intervalos superiores a 1 hora, ratos com lesões hipocâmpais tiveram seu desempenho prejudicado na tarefa de reconhecimento de objetos.

Em um estudo desenvolvido por Broadbent et al (2004) avaliou-se os efeitos de lesões hipocampais de várias proporções na memória de reconhecimento de objetos em ratos produzidas pela injeção de uma neurotoxina. O estudo demonstrou que os ratos que sofreram lesão acima de 30% do volume total do hipocampo tiveram seu desempenho severamente prejudicado no teste de reconhecimento de objetos.

No estudo proposto por Ainge et al (2006) foi verificada a memória de reconhecimento em animais que sofreram lesão hipocampal parcial e completa comparado aos animais que receberam os procedimentos cirúrgicos, mas que não sofreram lesão (Grupo Sham). O teste foi conduzido em uma arena quadrada de madeira e o animal permanecia nela até completar 30 segundos de exploração dos objetos. Os resultados do experimento demonstraram que os grupos com lesão completa de hipocampo demonstraram menor preferência pelo objeto novo comparado aos outros grupos, além de demorar mais tempo que o Grupo Sham para acumular os 30 segundos de exploração.

Desta forma, sendo a desnutrição um evento que compromete a formação correta do sistema hipocampal, haveria um prejuízo dos animais em reterem informações relativas ao reconhecimento dos objetos. Essa hipótese é reforçada pelos resultados da análise dos dados obtidos no presente trabalho. Os dados demonstram que os animais desnutridos tiveram seu desempenho prejudicado em todos os testes de reconhecimento de objetos, uma vez que despendem praticamente o mesmo tempo explorando os objetos conhecidos e novos. Isso se deve provavelmente ao fato das características do primeiro não serem devidamente memorizadas independentemente do intervalo utilizado entre o reconhecimento do primeiro e segundo objetos e do modelo adotado para medir a preferência pelo objeto novo em tarefas de reconhecimento de objetos.

Os dados encontrados corroboram os resultados de trabalhos presentes na literatura descritos acima, já que relatam que a integridade da memória de reconhecimento depende da

formação correta da região hipocampal (CLARK et al, 2000; MUMBY et al, 2002; MANNS et al, 2003; BROADBENT, 2004; AINGE, 2006).

O teste de memória de reconhecimento de objetos, realizado no aparato do campo aberto introduz elementos espaciais e contextuais, fatores esses que são sensíveis ao dano hipocampal (AINGE et al, 2006), já que o hipocampo seria responsável pelo processamento de memórias ligadas tanto aos aspectos espaciais, quanto pelos contextuais, assim como na associação entre ambos os fatores (MANNS, EICHENBAUM, 2009).

O trabalho desenvolvido por Dix e Aggleton (1999) demonstra que ratos inseridos em um teste de memória de reconhecimento em que a variável entre as fases de aquisição e teste é a posição modificada de um dos objetos tendem a explorar mais o objeto localizado em posição diferente daquela que foi previamente experimentada pelo animal, já que o animal aprenderia a localização prévia desse objeto, sendo capaz de reconhecer quando houver rearranjos espaciais. No presente trabalho, os animais desnutridos demonstraram não reconhecer a mudança na posição do objeto, já que exploraram da mesma forma e praticamente pelo mesmo tempo os objetos conhecido e novo, ao contrário dos animais controle que demonstraram preferência pelo objeto localizado em posição diferente. Dessa forma, a desnutrição, como um evento que compromete a formação correta do hipocampo, que por sua vez exerce um papel preponderante na aquisição e estocagem de memórias espaciais, prejudicou os animais na memorização das posições prévias dos objetos, o que fez com que na fase de teste não houvesse diferenças na exploração dos objetos. Os dados obtidos nos teste de memória de reconhecimento para localizações espaciais deste trabalho estão de acordo com outros trabalhos existentes na literatura que demonstram que esse tipo de memória é afetada por danos ocasionados à região hipocampal (MUMBY et al, 2002; LANGSTON, WOOD, 2009).

No que se refere à memória para contextos, Dix e Aggleton (1999) realizaram um experimento no qual se encontrou que ratos exploram mais um objeto quando ele está

localizado em um contexto diferente daquele em que foi previamente encontrado. Dessa forma, os ratos seriam capazes de identificar pistas contextuais relacionando a elas o evento da exploração, reconhecendo, assim, o contexto no qual se deu o encontro com determinadas pistas (DIX, AGGLETON, 1999). Essa associação entre a lembrança de um encontro e reconhecimento da situação em que se deu o encontro constitui-se características inerentes à memória episódica (BUDSON, 2009). No presente trabalho, encontro-se que ratos desnutridos despendem praticamente o mesmo tempo na exploração dos objetos pertencentes e não-pertencentes a um contexto específico, o que demonstra o não reconhecimento de que determinado objeto não estava localizado dentro daquele ambiente quando se deu a fase de aquisição. Ao contrário disto, os animais controles demonstram a mesma preferência espontânea pelo objeto novo no ambiente que aquela demonstrada pelos trabalhos de Dix e Aggleton (1999). Dessa forma, o comprometimento na formação correta da região hipocampal ocasionado pela desnutrição foi responsável por acarretar déficits no índice de reconhecimento de contexto dos animais desnutridos, já que mesmo após o período de recuperação nutricional, esses animais não demonstraram os mesmos índices alcançados pelos animais controle. Esses dados relacionam-se aos existentes na literatura que demonstram que danos causados a região hipocampal comprometem os animais em tarefas que envolvem memória de reconhecimento em contextos específicos (MUMBY, et al 2002; O'BRIEN et al, 2006; LANGSTON, WOOD, 2009).

Com relação aos dados obtidos durante a fase de aquisição do Experimento 1, foi analisada a exploração do objeto durante os dez minutos em que o animal foi exposto à sua presença a fim de verificar se a diferença entre os índices de reconhecimento dos animais controle e desnutridos fosse devida a déficits de exploração do objeto durante a fase de aquisição, já que se essa diferença fosse verificada os menores índices de reconhecimento dos animais desnutridos seriam devido à déficits de exploração e não à problemas no processamento da memória de reconhecimento. Entretanto, os dados obtidos no presente

trabalho indicam que não houve diferenças significativas entre os grupos na exploração do objeto durante a fase de aquisição, descartando que as diferenças no índice de reconhecimento fossem devidas a prejuízos na fase de aquisição. Esse resultado está em concordância com outros dados presentes na literatura que demonstram que ratos submetidos a lesões do hipocampo não apresentam déficits de exploração dos objetos a eles apresentados durante a fase de aquisição (VNEK, ROTHBLAT, 1996; MUMBY, 2005; GASKIN et al, 2010) o que indicaria que as diferenças nos índices de reconhecimentos de animais lesionados e operados (Grupo Sham) fossem devidas à problemas na consolidação da memória, já que o hipocampo seria a estrutura responsável pela estocagem de informações para posterior evocação, o que não se dá de maneira satisfatória na ocorrência de lesões ou problemas de desenvolvimento (ROSSATO et al, 2007).

As medidas de levantamentos (rearings) e quadrados cruzados foram feitas a fim de se descartar a possibilidade de que as alterações produzidas pela desnutrição sobre a atividade exploratória pudessem influir na análise dos resultados. Os dados obtidos neste trabalho demonstram que tanto animais controle quanto desnutridos apresentam a mesma atividade exploratória indicando que a desnutrição não afetou este comportamento. O trabalho desenvolvido por Façolin-Silva et al (2006) demonstra que o tratamento nutricional imposto no estágios iniciais da vida – juntamente com a ocorrência de recuperação nutricional - não comprometeu a atividade exploratória e locomotora dos animais desnutridos no experimento do Labirinto em Cruz Elevado o que corrobora os dados obtidos neste trabalho.

No que diz respeito às análises minuto a minuto realizadas nos procedimentos um, dois e três do segundo experimento, observou-se que ambos os grupos demonstram um decréscimo de exploração do objeto novo, assim como dos demais objetos ao longo dos cinco minutos de teste. Esse dado está de acordo com outros encontrados na literatura que indicam que em experimentos que medem preferência espontânea dos animais a análise dos minutos

separadamente demonstra uma curva de habituação, já que os animais estariam habituando-se a novidade ao longo do teste, mesmo quando os animais sofreram algum tipo de lesão do hipocampo (DIX, AGGLETON, 1999; CLARK, ZOLA, SQUIRE, 2000; MUMBY, 2001; MUMBY, 2002).

Baseado nos dados discutidos no presente trabalho, conclui-se que a desnutrição protéica precoce:

- Prejudicou o desempenho dos animais nos procedimentos que envolvem memória de reconhecimento de objetos.
- Prejudicou o desempenho dos animais no reconhecimento de objeto novo.
- Prejudicou o desempenho dos animais no reconhecimento de objeto em cenas complexas
- Prejudicou o desempenho dos animais no reconhecimento espacial de objetos.
- Prejudicou o desempenho dos animais no reconhecimento contextual de objetos.

AINGE, J.A.; HERON-MAXWELL, C.; THEOFILAS, P.; WRIGHT, P.; HOZ, L.; WOOD, E.R. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. **Behavioural Brain Research**, v. 167, p. 183 – 195, 2006.

ALMEIDA, S.S.; DE ARAÚJO, M. Postnatal protein malnutrition affects play behavior and other social interactions in juvenile rats. **Physiology & Behavior**, v.74, p. 41-51, 2001.

ALMEIDA, S.S.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Prenatal protein malnutrition affects the social interactions of juvenile rats. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 1, p. 197 – 201, 1996.

BARNES, R. H.; NELLY, C. S.; KWONG, E.; LABADAN, B. A.; FRANKOVA, S. Postnatal nutrition deprivations as determinants of adult rats behavior toward food, its consumption and utilization. **Journal of Nutrition**, vol. 96, p. 467 - 476, 1968.

BAYER, S.A. Development of hippocampal region in the rat I: Neurogenesis examined with H-thymidine autoradiography. **Journal of Comparative Neurology**, v. 190, p. 87 – 114, 1980.

BAYER, S.A. Development of hippocampal region in the rat II: Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. **Journal of Comparative Neurology**, v. 190, p. 115 – 134, 1980.

BAYER, S.A.; ALTMAN, J. Hippocampal development in the rat: cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level- X-irradiation. **Journal of Comparative Neurology**, v. 158, p. 55 – 80, 1974.

BEAVINS, R.A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory”. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1306 – 1311, 2006.

BERLYNE, D.E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior. **British Journal of Psychology**, v. 41, p. 68 – 80, 1950.

BLACK, R.E.; ALLEN, L.H.; BHUTTA, Z.A.; CAULFIELD, L.E; ONIS, M.; EZATTI, M.; MATHERS, C.; RIVERA, J. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **Lancet**, v. 371, p. 243 – 260, 2008.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. FUNASA quer combater desnutrição indígena. Disponível em <http://www.fomezero.gov.br/noticias>. Acessado em 24 de fevereiro de 2010.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. Chamada Nutricional Quilombola. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Social. Chamada Nutricional para crianças menores de cinco anos de idade no estado do Amazonas. Brasília, DF, 2006.

BROADBENT, N.J.; GASKIN, S.; SQUIRE, L.; CLARK, R.E. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learning & Memory**, v.17, p.794-800, 2010.

BROADBENT, N.J.; SQUIRE, L.R.; CLARK, R.E. Spatial memory, recognition memory and the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v 101, n. 40, p. 14515 – 14520, 2004.

BUDSON, A.E. Understanding memory dysfunction. **The Neurologist**, v. 15, n. 2, p. 71 – 79, 2009.

CACERES, L.G.; BERTOLINO, L.A.; SARACENO, G.E.; ZUBILETE, M.A.Z.; URAN, S.L.; CAPANI, F.; GUELMAN, R. Hippocampal-related memory deficits and histological damage induced by neonatal ionizing radiation exposure: Role of oxidative status. **Brain Research**, v. 1312, p. 67 – 78, 2010.

CAMBRAIA, R. P. B.; VANNUCCHI, H. & DE OLIVEIRA, L. M. Foods intake and weight of lactating rats maintained on different protein-calorie diets, and pup growth. **Brazilian Journal oh Medical Biological Research**, vol. 30, p. 985 – 988, 1997.

CATÂNIA, A.C. Aprendizagem: Comportamento, Linguagem e Cognição. **Journal of Applied Behavior Analysis**, Artmed, 1999.

CAYRE, M.; CANOLL, P.; GOLDMAN, J.E. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, v.88, p. 41 -63, 2009.

CLARK, R.E.; ZOLA, S.M.; SQUIRE, L.R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 8853 – 8860, 2000.

DIAZ-CINTRA, S.; GONZÁLEZ-MACIEL, A; MORALES, M.A; AGUILAR, A.; CINTRA, L; PRADO-ALCALÁ, R.A. Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1-3 subfields of the dorsal hippocampus. **Experimental Neurology**, v. 208, p. 47 – 53, 2007.

DIX, S.L.; AGGLETON, J.P. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. **Behavioural Brain Research**, v. 99, p. 191 – 200, 1999.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: Davidson, N.A. & Dobbing, J. (Eds.) **Applied Neurochemistry**. Oxford Blacwell Scientific Publications, Ltda. p. 287 – 316, 1968.

DODART, J. C.; MATHIS, C. & URGERER, A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. **Neuroreport**, v.8, p. 1173 – 1178, 1997.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behavioral Brain Research**, v. 31, p. 47 – 59, 1988.

ENNACEUR, A.; MICHALIKOVA, S.; BRADFORD, A.; AHMED, S. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 159, p. 247 – 266, 2005.

ERGORUL, C.; EICHENBAUM, H. The hippocampus and memory for “what”, “where”, and “when”. **Learning & Memory**, v. 11, p. 397 – 405, 2004.

FEOLI, A.M.; LEITE, M.C.; TRAMONTINA, A.C.; TRAMONTINA, F.; POSSER, T.; RODRIGUES, L.; SWAROWSKY, A.; QUINCOZES-SANTOS, A.; LEAL, R.B.; GOTTFRIED, C.; PERRY, M.L.; GONÇALVES, C.A. Developmental changes in content glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. **Brain Research**, v. 1187, p. 33 – 41, 2008.

FERNANDES, D.C. Una revisión de los modelos de la memoria de reconocimiento y sus hallazgos empíricos. **Revista de psicología da Vetor Editora**, v. 6, n. 2, p. 23 – 32, 2005.

FORWOOD, S.E.; BARTKO, S.J.; SAKSIDA, L.M.; BUSSEY, T.J. Rats spontaneously discriminate purely visual, two-dimensional stimuli in testes of recognition memory and perceptual oddity. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, n. 5, p. 1032 – 1042, 2007.

FRANÇOLIN-SILVA, A.L.; HERNANDES, A.S.; FUKUDA, M.T.H.; VALADARES, C.T.; ALMEIDA, S.S. Anxiolytic-like effects of short-term postnatal protein malnutrition in the elevated plus-maze test. **Behavioral Brain Research**, v. 173, p. 310 – 314, 2006.

FUKUDA, M.T.; FRANÇOLIN-SILVA, A.L.; HERNANDES, A.S.; VALADARES, C.T.; ALMEIDA, S.S. Effects of early protein malnutrition and scopolamine on learning and memory in the Morris water maze. **Nutritional Neuroscience**, v. 10, n. 5-6, p. 251 – 259, 2007.

GALLER, J.R.; SHUMSKY, J.S.; MORGANE, P.J. Malnutrition and brain development. In: Walker, W.A. and Watkins j. (Eds.) **Nutrition in Pediatrics**. 2nd edition. France: Plenum Press, p. 194 – 210, 1995.

GASKIN, S.; TARDIF, M.; COLE, E.; PITERKIN, P.; KAYELLO, L.; MUMBY, D.G. Object familiarization and novel-object preference in rats. **Behavioural Processes**, v. 83, p. 61 – 71, 2010.

GE, K.Y; CHANG, S.Y. Definition and measurement of child malnutrition. **Biomedical and Environmental Sciences**, v, 14, n.4; p. 283 – 291, 2001.

GEORGIEF, F. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 6145 - 6205, 2007.

GOOD, M. A.; BARNES, P.; STAAL, V.; MCGREGOR, A.; HONEY, R. C. Context- but not familiarity-dependent forms of object recognition are impaired following excitotoxic hippocampal lesions in rats. **Behavioural Neuroscience**, v. 121, n. 1, p.218 – 223, 2007.

GOULD, E.; TANAPAT, P. Stress and hippocampal neurogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 1472 – 1479, 1999.

HELENE, A.F.; XAVIER, G.F. Building attention from memory. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.25, supl. II, p. 12 – 20, 2003.

HELENE, A.F.; XAVIER, G.F. Memória (a elaboração da) percepção, imaginação, inconsciente e consciência. In: Landeira-Fernandez, J.; Silva, M.T.A. (Orgs.) *Intersecções entre psicologia e neurociências*, Rio de Janeiro: MedBook, 2007.

HERNANDES, A.S.; FRANÇOLIN-SILVA. A.L.; VALADARES, C.T.; FUKUDA, M.T.H.; ALMEIDA, S.S. Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. **Behavioral Brain Research**, v.162, p. 240 – 245, 2005.

HERNÁNDEZ, A.; BURGOS, H.; MONDACA, M.; BARRA, R.; NÚÑEZ, H.; PÉREZ, H.; SOTO-MORANO, R.; SIERRALTA, W.; FERNÁNDEZ, V.; OLIVARES, R.; VALLADARES, L. Effect of prenatal protein malnutrition on long-term potentiation and BDNF protein expression in the rat entorhinal cortex after neocortical and hippocampal tetanization. **Neural Plasticity**, p.1-9, 2008.

IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: Artmed, 2002.

IMAYOSHI, I.; SAKAMOTO, M.; OHTSUKA, T.; KAGEYAMA, R. Continuous neurogenesis in the adult brain. **Development, Growth & Differentiation**, v. 42, p. 239 – 244, 2009.

KALIA, M. Brain development: anatomy, connectivity, adaptative plasticity, and toxicity. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 57 (supl. 2), p. 52 – 55, 2008.

LANGSTON, R.F.; WOOD, E. Associative recognition and the hippocampus: Differential effects of hippocampus lesions on object-place, object-context and object-place-context memory. **Hippocampus** (in press), 2009.

LAVENEX, P.; LAVENEX, P.B.; AMARAL, D.G. Postnatal development of the primate hippocampal formation. **Developmental Neuroscience**, v. 29, p. 179 – 192, 2007.

LEE, E.; SON, H. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. **Biochemistry and Molecular Biology Reports**, v. 42, p. 239 – 244, 2009.

LEVITSKY, D.A.; BARNES, R.H. Nutrition and environmental interactions in the behavioral development of the rat: long-term effects. **Science**, v. 176, p. 68 – 71, 1972.

LISTER, J.P.; BLATT, G.J.; DEBASSIO, W.A.; KEMPER, T.L.; TONKISS, J.; GALLER, J.R.; ROSENE, D.L. Effect of prenatal protein malnutrition on number of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. **Hippocampus**, v. 15, n. 3; p. 393 – 403, 2005.

LISTER, J.P.; TONKISS, J.; BLATT, G.J.; KEMPER, T.L. DEBASSIO, W.A.; GALLER, J.R.; ROSENE, D.L. Asymmetry of neuron numbers in the hippocampal formation of prenatally malnourished and normally nourished rats: a stereological investigation. **Hippocampus**, v. 16, n.11, p. 946 – 958, 2006.

LOBE, S.L.; BERNSTEIN, M.C.; GERMAN, R.Z. Life-long protein malnutrition in the rat (*Rattus norvegicus*) results in altered patterns of craniofacial growth and smaller individuals. **Journal of Anatomy**, v. 208, p. 795 – 812, 2006.

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

MANNS, J.R.; EICHENBAUM, H. A cognitive map for object memory in the hippocampus. **Learning & Memory**, v. 16, p. 616 – 624, 2009.

MANNS, J.R.; HOPKINS, R.O.; REED, J.M.; KITCHENER, E.G.; SQUIRE, L.R. Recognition memory and the human hippocampus. **Neuron**, v.37, p. 171 – 180, 2003.

MIÑANA-SOLIS, M.D.C.; ESCOBAR, C. Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term impairment, in contrast to earlier and later periods. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 422 – 432, 2008.

MONTEIRO, C.A.; BENICIO, M.D.D.A.; KONNO, S.C.; DA SILVA, A.C.F.; LIMA, A.L.L. CONDE, W.L. Causas do declínio da desnutrição infantil no Brasil, 1996 – 2007. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 1, p. 35 – 43, 2009.

MORGANE, P.J.; AUSTIN, K.; LAFRANCE, R.J.; BRONZINO, J.D.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of brain. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v.17, p. 91 – 128, 1993.

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

MUMBY, D.G. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 127, p. 159 – 181, 2001.

MUMBY, D.G.; GASKIN, S.; GLENN, M.J.; SCHRAMEK, T.E; LEHMANN, H. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places and contexts. **Learning & Memory**, v.9, p. 49 – 57, 2002.

MUMBY, D.G.; PINEL, J.P.J.; KORNECOOK, T.J., SHEN, M.J.; REDILA, V.A. Memory deficits following lesions of hippocampus or amygdale in rat: assessment by an object-memory test battery. **Psychobiology**, v. 23, n. 1, p. 26 – 36, 1995.

MUMBY, D.G.; TREMBLAY, A.; LECLUSE, V.; LEHMANN, H. Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. **Hippocampus**, v. 15, p. 1050 – 1056, 2005.

O'BRIEN, N.; LEHMANN, H.; LECLUSE, V.; MUMBY, D.G. Enhanced context-dependency of object recognition in rats with hippocampal lesions. **Behavioural Brain Research**, v. 170, p. 156 – 162, 2006.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Oxford University Press, 1978.

PALCHYKOVA, S.; WINSKY-SOMMERER, R.; MEERLO, P.; DÜRR, R.; TOBLER, I. Sleep deprivation impairs object recognition in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, n. 3, p. 263 – 271, 2006.

PASSOS, O.J. *et al.* Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, v. 11, n.20, p. 1603 – 1612, 2000.

PLATT, B.S. Proteins in nutrition. **Proceedings of the Royal Society of London: Biological Sciences**, v.18, p. 337 – 344, 1962.

PLATT, B.S.; STEWART, R.J. Reversible and irreversible effects of protein-calorie deficiency on the central nervous system of animals and man. **World review of nutrition and dietetics**, v. 13, p. 43 – 85, 1971.

PRESTES-CARNEIRO, L.E.; LARAYA, R.D.; SILVA, P.R.C.; MOLITERNO, R.A.; FELIPE, I.; MATHIAS, P.C. Long-term effect of early protein malnutrition and growth curve, hematological parameters and macrophage function of rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 52, p. 414 – 420, 2006.

RAFAEL, J.F.; MORA, M.D. Malnutrition: organic and functional consequences. **World Journal of Surgery**, v. 23, p. 530 – 535, 1999.

RANADE, S.C.; ROSE, A.; RAO, M.; GALLEGU, J.; GRESSE, N.S.P.; MANI, S. Different types of nutritional deficiencies affect different domains of spatial memory function checked in a radial arm maze. **Neuroscience**, v. 152, p. 859 – 866, 2008.

REGER, M.L.; HOVDA, D.A.; GIZA, C.C. Ontogeny of rat recognition memory measured by novel object recognition task. **Developmental Psychobiology**, p. 672 – 678, 2009.

RICE, D.; BARONE JR, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 3, p. 511 – 533, 2000.

ROSSATO, J. I.; BEVILAQUA, L. R. M.; MYSKIW, J. C.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning & Memory**, v. 14, p. 36 – 46, 2007.

SANTUCCI, L. B. *et al.* Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animals models of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, vol. 49, p. 393 – 398, 1994.

SCRIMSHAW, N.S. Malnutrition, Learning and Behavior. **The American Journal of Clinical Nutrition**. V. 20, n.5, p. 493 – 502, 1967.

STECKLER, T.; DRINKENBURG, N.H.I.M.; SAHGAL, A.; AGGLETON, J.P. Recognition memory in the rat I: Concepts and classification. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 289 – 311, 1998.

VICTORA, C.G.; ADAIR, L.; FALL, C.; HALLAL, P.C.; MARTORELL, R.; RICHTER, L.; SACHDEV, H.S. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. **Lancet**, v. 371, p. 243 – 260, 2008.

VNEK, N; ROTHBLAT, L.A. The hippocampus and long-term object memory in the rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 2780 – 2787, 1996.