

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NEUROCIÊNCIAS**

**Efeito da desnutrição protéica em ratos submetidos
à hipóxia-isquemia neonatal**

Eduardo Farias Sanches

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ionara Rodrigues Siqueira

Porto Alegre

2010

“O homem é mortal por seus temores e imortal por seus desejos.”

Pitágoras

Dedico este trabalho a meu pai Edu (*in memoriam*),
Anair, Edu e a Vanessa Lora.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao Professor Carlos Alexandre Netto pelo exemplo como professor, pesquisador e como pessoa. Espero que tenhas a consciência da importância que tens em minha vida. Muito obrigado por tudo.

À Professora Ionara, pela disponibilidade em me co-orientar, pela presteza com que sempre ajudou em meu projeto, tanto na fase de elaboração, quanto em sua execução. É uma grande pesquisadora, pela qual tenho grande respeito e admiração.

Aos alunos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, em especial, aos amigos de “estresse oxidativo” Karine, Felipe, Chris, “Nanis”, “Iuri”, Lucas, Gi, “Bibieine” que encararam no inverno passado várias manhãs de chuva e frio para que parte desse experimento se realizasse.

Ao Professor Marcos Perry e alunos de seu grupo de pesquisa, a quem também devo a realização deste trabalho. Muito obrigado pela troca de experiências e pela disponibilidade em me ajudar sempre.

À Professora Carla Dalmaz e todos os alunos do grupo do Estresse, mas em especial à Luisa, que me apresentou ao grupo do professor Carlos Alexandre. Muito obrigado pelo companheirismo e pela ótima convivência que me proporcionam a cada dia que passa.

Agradeço a todos os colegas do laboratório 35 pela ajuda, sem a qual com certeza este trabalho não teria sido realizado. Todos, de alguma forma, têm parte nesse trabalho! Vamos por ordem alfabética para não gerar ciúmes: Alessandra, Aline, Atahualpa, Cibele, Déborah, Fabrício, Fabrício Simão, Fernanda, Gean, Janine, Jaqueline, Joseane, Juliana, Lauren, Lígia, Luciano, Marilucia, Patrícia, Paulo, Rafael, Régis, Simone e Simone Assis. A duas colegas do grupo devo agradecimento especial: a Lenir pelos ensinamentos das técnicas da hipóxia-isquemia e a Nice, que segundo, o Professor Alex foi um anjo que apareceu na hora certa em meu trabalho e que sem ela eu possivelmente não teria vencido esta etapa. Obrigado do fundo do coração!

Aos amigos do LaBIMET e do PPG FISILOGIA, que por intermédio da Vanessa vim a conhecer. Muito obrigado pelo companheirismo e amizade que tenho certeza, terá longa duração.

A minha família, em especial a minha mãe, pelo exemplo de caráter, dedicação e perseverança. Ter sido pai e mãe de dois “anjinhos” que ainda dão muito trabalho não deve ser tarefa fácil. Agradeço por toda a ajuda que me tem dado e sem a qual certamente não estaria aqui hoje concluindo a pós-graduação.

A minha família Lora: seu Geromi, dona Tere, Bruna, Cássio e Matheus, muito obrigado pelo carinho.

Aos professores e funcionários do PPGNEURO pelos ensinamentos, atenção e disponibilidade dispensada.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e do ICBS. Pessoal do biotério, da segurança, da limpeza que contribuem para que os trabalhos em andamento tenham as melhores condições de realização.

Em especial (e como ela mesma pediu) dedico a Vanessa um parágrafo inteiro. Minha “eterna namorada”, muito obrigado por toda a ajuda nos momentos difíceis pelos quais passamos juntos. Posso me considerar a pessoa mais sortuda do mundo por ter te conhecido. Desde que começamos nosso relacionamento minha vida mudou completamente e devo te agradecer por isso. Seja para sempre essa pessoa a quem admiro e amo muito.

SUMÁRIO

Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	v
Resumo.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	03
1.1 Desnutrição.....	04
1.2 Desnutrição e Sistema Nervoso Central.....	08
1.3 Modelos de desnutrição.....	11
1.4 Desnutrição Protéica.....	12
1.5 Desnutrição protéica e estresse oxidativo.....	13
1.6 Desnutrição protéica e asfixia perinatal.....	16
1.7 Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica.....	17
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Desenho Experimental.....	25
3.3 Dietas.....	27
3.4 Hipóxia-isquemia.....	29
3.5 Análise Bioquímica.....	30
3.5.1 Preparação dos homogeneizados.....	30
3.5.2 Ensaio de 2',7' diclorofluoresceína (DCF).....	31
3.5.3 Ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs).....	31
3.5.4 Determinação dos tióis celulares (TRI).....	32
3.5.5 Quantificação dos resíduos de triptofano.....	32

3.5.6 Determinação da concentração de proteínas.....	33
3.6 Análise Comportamental.....	33
3.6.1 Geotaxia negativa.....	34
3.6.2 Preensão palmar.....	34
3.6.3 Reflexo de endireitamento.....	35
3.6.4 <i>Rota-rod</i>	35
3.6.5 Campo aberto.....	36
3.6.6 Teste olfatório.....	37
3.6.7 Esquiva inibitória.....	38
3.7 Análise Morfológica.....	39
3.8 Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS	40
4.1 Avaliações ponderais.....	41
4.2 Testes motores.....	44
4.3 Estado oxidativo celular.....	46
4.4 Comportamento olfatório.....	49
4.5 Campo aberto.....	50
4.6 <i>Rota-Rod</i>	53
4.7 Esquiva inibitória.....	54
4.8 Peso encefálico.....	55
4.9 Dano cerebral.....	57
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

ABREVIATURAS

AMPA: ácido a-amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

ANOVA: análise de variância

CAT: catalase

DCFH-DA: 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato

DCF: 2'-7'- diclorofluoresceína

DG: Dia Gestacional

DNA: ácido desoxirribonucléico

D.P: desvio padrão

DTNB: ácido 5,5'- ditiobis-2-nitrobenzóico

EHI: encefalopatia hipóxico-isquêmica

E.P: erro padrão

GABA: ácido-aminobutírico

GPx: glutathione peroxidase

HI: hipóxia-isquemia

HIDN: grupo hipóxia-isquemia desnutrido

HINN: grupo hipóxia-isquemia normonutrido

HDN: grupo hipóxia desnutrido

HNN: grupo hipóxia normonutrido

IDN: grupo isquemia desnutrido

INN: grupo isquemia normonutrido

MDA: malondialdeído

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

NOS: óxido-nítrico sintase

O²⁻: radical superóxido

OH⁻: radical hidroxil

OMS: organização mundial de saúde

PBS: salina tamponada com fosfato ("phosphat buffer saline")

pH: potencial hidrogeniônico

PND: dia pós-natal

PKC: proteína quinase C

RNA: ácido ribonucléico

RPM: rotações por minuto

SNC: sistema nervoso central

SHAMDN: grupo sham desnutrido

SHAMNN: grupo sham normonutrido

SOD: superóxido dismutase

SPSS: statistical package for the social sciences

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

ROS: espécies reativas de oxigênio

RO[•]: radical alcoxil

ROO[•]: radical peroxil

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Principais causas de morte em neonatos e crianças abaixo de 5 anos no mundo.....	06
FIGURA 2 - Curva de velocidade, comparando índices relativos, duração e tempo do processo de desenvolvimento específicos no SNC de ratos e humanos.....	10
FIGURA 3 - Esquema ilustrativo da fisiopatologia da encefalopatia hipóxico-isquêmica.....	20
FIGURA 4 - Esquema ilustrativo do desenho experimental utilizado.....	27
FIGURA 5 - Procedimento de Levine, modificado por Rice, que se utiliza da combinação de hipóxia e isquemia.....	29
FIGURA 6 - Ilustração do teste de geotaxia negativa.....	34
FIGURA 7 - Foto do aparelho utilizado no teste de <i>Rota-rod</i>	36
FIGURA 8 - Ilustração da arena do teste do Campo aberto.....	37
FIGURA 9 - Foto ilustrativa do teste de comportamento olfatório.....	38
FIGURA 10 - Foto do aparelho utilizado no teste de esquiva inibitória.....	39
FIGURA 11 - Ganho de peso das ratas-mães no período gestacional.....	41
FIGURA 12 - Ganho de peso das ninhadas no período pós-natal.....	42

FIGURA 13 - Comportamento olfatório dos animais aos 7 dias.....	49
FIGURA 14 - Número de cruzamentos realizados no 1º e 2º minutos na tarefa de campo aberto.....	50
FIGURA 15 - Número de cruzamentos realizados no 4º e 5º minutos na tarefa de campo aberto.....	51
FIGURA 16 - Número de respostas de orientação vertical realizados no 1º e 2º minutos na tarefa de campo aberto.....	51
FIGURA 17 - Número de respostas de orientação vertical realizados no 4º e 5º minutos na tarefa de campo aberto.....	52
FIGURA 18 - Latência para deixar o quadrante central do campo aberto.....	52
FIGURA 19 - Tempo de permanência em movimento sobre o cilindro no teste de <i>Rota-Rod</i>	53
FIGURA 20 - Latência para descer da plataforma no teste da esquiva inibitória.....	54
FIGURA 21 - Peso encefálico total dos animais aos 60 dias.....	55
FIGURA 22 - Peso do hemisfério cerebral direito dos animais aos 60 dias.....	56
FIGURA 23 - Peso do hemisfério cerebral esquerdo dos animais aos 60 dias.....	56
FIGURA 24 - Efeito da desnutrição sobre o dano encefálico causado pela hipóxia-isquemia neonatal.....	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição nutricional das dietas (g/kg de dieta).....	28
TABELA 2 - Avaliação do ganho de massa corporal de ratos do PND11 à vida adulta (PND60).....	43
TABELA 3 - Reflexo de endireitamento.....	44
TABELA 4 – Reflexo de geotaxia negativa.....	45
TABELA 5 – Reflexo de preensão palmar.....	45
TABELA 6 - Medidas do estado oxidativo celular em estriado do hemisfério cerebral direito 4hs após a hipóxia-isquemia neonatal.....	46
TABELA 7 - Medidas do estado oxidativo celular em hipocampo do hemisfério cerebral direito 4hs após a hipóxia-isquemia neonatal.....	47
TABELA 8 - Medidas do estado oxidativo celular em cerebelo 4hs após a hipóxia-isquemia neonatal.....	47
TABELA 9 - Medidas do estado oxidativo celular em hipotálamo 4hs após a hipóxia-isquemia neonatal.....	48

RESUMO

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal é uma causa importante de dano cerebral que ocorre durante o desenvolvimento cerebral podendo levar a seqüelas neurológicas de grande impacto na vida do indivíduo. Outra condição que afeta o desenvolvimento neurológico é o estado nutricional. A desnutrição durante o período perinatal afeta vários aspectos do desenvolvimento neural, incluindo alterações morfológicas, bioquímicas e comportamentais. Além disso, a desnutrição pode influenciar diferentes etapas da cascata de eventos fisiopatológicos responsáveis pelo dano cerebral hipóxico-isquêmico. Este trabalho teve por objetivo estudar os efeitos da desnutrição protéica gestacional e lactacional sobre parâmetros bioquímicos, comportamentais e morfológicos em ratos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal. Ratas Wistar foram submetidas à restrição protéica durante a gestação e a lactação (grupo controle: 25% de proteína de soja e grupo desnutrido: 7% de proteína). Aos sete dias de vida pós-natal, seus filhotes foram submetidos ao procedimento de hipóxia-isquemia cerebral unilateral. Esses animais foram quanto a parâmetros bioquímicos aos 7 dias de vida, comportamentais, aos 7 e 60 dias de vida e morfológicos aos 60 dias. Os animais apresentaram marcada redução de peso corporal durante o período lactacional. Aos 60 dias, quando sacrificados, os animais desnutridos apresentavam peso encefálico significativamente menor. O estado oxidativo celular foi avaliado 4 horas após o final da hipóxia, não tendo sido encontradas alterações na formação de radicais livres, lipoperoxidação, danos a proteínas e sistemas de defesa antioxidante. Não foram observados atrasos no

desenvolvimento motor, quanto ao fator dieta, nem quanto ao fator hipóxia-isquemia nos animais de 7 e 60 dias de vida, observados pelos testes de geotaxia negativa, reflexo de endireitamento, preensão palmar, *Rota-rod* e campo aberto. Foi encontrado um prejuízo ao sistema olfatório dos animais, medido pela capacidade dos animais em encontrar seus ninhos, sendo esse prejuízo significativamente maior nos animais hipóxico-isquêmicos desnutridos, o que indica uma interação entre a dieta e a hipóxia-isquemia neonatal. Quanto ao dano morfológico ocasionado pelo evento hipóxico-isquêmico, foi verificada uma diminuição do dano hemisférico gerado pela HI nos animais desnutridos. Com base nestes resultados, podemos sugerir que ocorreu uma adaptação relativa à adversidade metabólica aguda (privação de oxigênio e glicose da hipóxia-isquemia) nos animais submetidos à dieta hipoprotéica, parecendo haver, ao menos com relação a alguns dos parâmetros avaliados, um caráter protetor gerado pela desnutrição protéica.

1. INTRODUÇÃO

Diversos conceitos vêm sendo descritos em pesquisas sobre o papel dos nutrientes presentes na dieta e suas relações com o desenvolvimento do indivíduo nas fases pré e pós-natal. Fatores biológicos associados às interferências do meio ambiente modulam o metabolismo, determinando sua eficácia funcional. Sob essa ótica, as condições de oferta de nutrientes são de fundamental importância para os vários sistemas corporais (DAUNCEY & BICKNELL, 1999; MORGANE *et al.*, 1992).

O estado nutricional é determinado pelo suprimento de nutrientes e pela utilização desses pelo organismo. A alimentação, a digestão, a absorção, e o metabolismo são processos que promovem o aproveitamento de substâncias orgânicas e inorgânicas provenientes do meio externo, as quais são incorporadas ao organismo e/ou utilizadas como fonte energética (MARCONDES, 1976).

Temas relacionando a dieta a processos patológicos têm sido muito estudados ao longo das últimas décadas. Sem dúvida, a nutrição encontra um grande espaço na pesquisa científica e isso se deve à vital importância do alimento para todos os seres vivos.

Vários processos patológicos que têm origem durante o desenvolvimento do sistema nervoso estão associados a lesões como a hipóxia, viroses, exposição a drogas ou à desnutrição no período intra-uterino (DAUNCEY & BICKNELL, 1999).

1.1 Desnutrição

A desnutrição é caracterizada como um problema de saúde causado pela ingestão de alimentos em quantidades insuficientes para o desenvolvimento e funcionamento ótimo do organismo. Pode ocorrer por falta ou insuficiência de nutrientes, por deficiências nos processos de transformação dos alimentos, na fase de absorção ou mesmo na utilização destes nutrientes pelo organismo. Sua origem é multifatorial e comumente está relacionada com baixo nível social e econômico, como também a outros fatores relacionados à produção, armazenamento, industrialização, distribuição e custo dos próprios alimentos (CAMPOS *et al.*, 1995).

Dentre os grupos mais afetados pela desnutrição, destacam-se: gestantes, lactentes, crianças e os idosos (DOUGLAS, 2002; ELIA, 2000). Segundo Madruga e colaboradores (2004), a fome e a desnutrição continuam sendo as principais causas de morbimortalidade de crianças no Brasil.

Os efeitos da desnutrição sobre o organismo vão depender de alguns fatores como o tipo (natureza da carência), a gravidade (grau da desnutrição), a fase em que a desnutrição ocorreu (pré e/ou pós-natal) e a duração do insulto, assim como a interação desses com outros fatores, como fatores genéticos e ambientais (MORGANE *et al.*, 1992).

De Onís e colaboradores (1993) relatam que a desnutrição assume redobrada importância durante a infância, em especial junto a crianças que vivem em condições socioeconômicas e culturais menos favorecidas. Crianças oriundas de classes sócio-econômicas baixas ainda sofrem privação cultural e educacional

causadora de deficiências graves no desenvolvimento intelectual e emocional, que se potencializam quando associados à desnutrição (DE ONÍS *et al.*, 2004). Embora considerada uma condição freqüente nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, os distúrbios nutricionais têm sido relatadas também em pacientes internados em redes hospitalares de países industrializados (BALINT, 1998).

Clinicamente, a desnutrição é freqüentemente dividida em duas categorias: o Marasmo e o Kwarshiorkor (ALMEIDA & RICCO, 1998). O termo marasmo foi descrito pela primeira vez por Pearson em 1925, como um “estado crônico de desnutrição grave” resultante de uma deficiência de proteínas e calorias (BALINT, 1998) e caracterizado pela perda de tecido muscular e adiposo, causando redução a cerca de 60% do peso corporal esperado para a idade (TRUSWELL, 1981). A deficiência essencialmente protéica foi definida em 1935, quando Cicely D. Williams descreveu a síndrome nutricional ocorrida em mães africanas, e a definiu como Kwarshiorkor. Palavra oriunda do continente africano, significando “primeira criança-segunda criança”, e vem da observação de que a primeira criança desenvolve Kwashiorkor quando a segunda criança nasce e a substitui no peito da mãe. Esse tipo de desnutrição é caracterizado pela perda de tecido muscular com preservação do tecido adiposo (WATERLOW, 1984).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 10 milhões de crianças abaixo de 5 anos morrem todo ano de doenças preveníveis e/ou tratáveis apesar das melhorias nas condições de atendimento nas redes hospitalares (WHO, 2003; AHMAD *et al.*, 2000) sendo pelo menos metade dessas mortes causada pela desnutrição (DE ONÍS *et al.*, 2004, CAMPOS *et al.*, 1995,

CAULFIELD *et al.*, 2004). Do total de óbitos, cerca de 80% das crianças pertencem ao continente asiático, 15% pertencem ao continente africano e 5% são latino-americanas (FAO/WHO 2005; FAO/WHO 2004) (FIGURA 1).

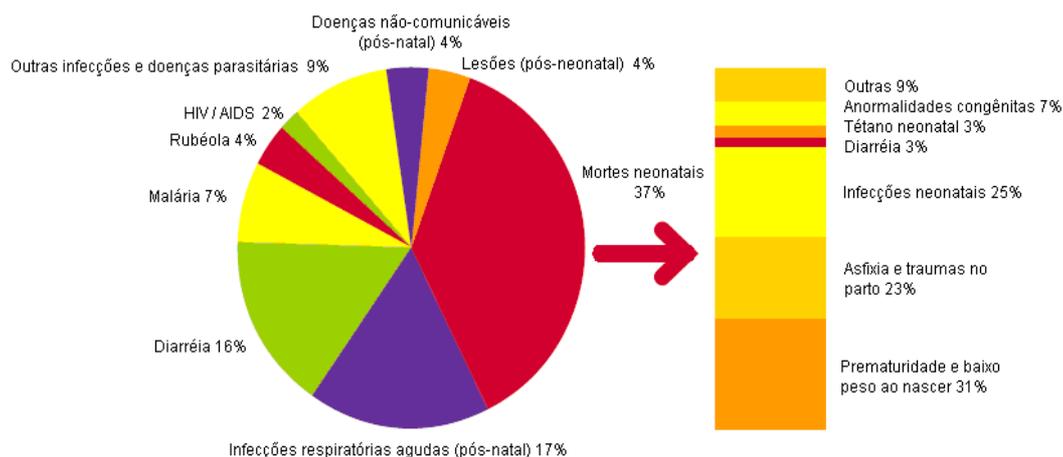


FIGURA 1 - Principais causas de morte em neonatos e crianças abaixo de 5 anos no mundo. 35% das mortes em crianças abaixo de 5 anos estão associadas à desnutrição. Fontes para estimativas e causas de morte neonatais e em crianças abaixo de 5 anos: Organização Mundial de Saúde. *The global burden of disease*. (2004 updated 2008). Para estimativas de desnutrição: Black R. *et al.*, 2008.

Wu e colaboradores (2004) apontam o estado nutricional como o fator intrauterino mais importante no desenvolvimento, alterando a expressão do genoma fetal e podendo ter conseqüências de longo prazo caso seja submetido a um insulto. Estas alterações podem resultar em adaptações no desenvolvimento, as quais alteram permanentemente a estrutura, fisiologia e metabolismo, podendo predispor a enfermidades metabólicas, endócrinas e cardiovasculares na vida adulta. Baixa estatura, *diabetes mellitus*, hipertensão, aterosclerose e doenças

cardiovasculares parecem ter origem em alterações ocorridas no útero e durante o início da vida pós-natal (JOSHI *et al.*, 2003).

Um fator agravante associado aos efeitos de longa duração, ou até mesmo permanentes é que vários dispositivos e práticas comportamentais, associados à desnutrição, tendem a ser transmitidos de geração a geração (MORGANE *et al.*, 2002). Hales & Barker (1992) propuseram a teoria do “fenótipo econômico” que propõe que o desenvolvimento fetal é sensível ao ambiente nutricional. Quando este ambiente é precário, uma resposta adaptativa é desencadeada para aperfeiçoar o crescimento de órgãos como o cérebro, em detrimento de outros. Esta programação fetal teria como objetivo aumentar as chances de sobrevivência do feto e resultaria em mudanças no metabolismo pós-natal, que também teria o objetivo de aumentar as chances de sobrevivência sob condições de nutrição precária e intermitente. Isto assinala a ocorrência de certa seletividade que privilegia órgãos indispensáveis à sobrevivência do indivíduo (FREITAS *et al.*, 1994; TAMARIN, 1963).

O primeiro mecanismo adaptativo que ocorre na desnutrição é uma atividade diminuída do desnutrido, quando comparado com a atividade de crianças alimentadas adequadamente. Este mecanismo tem por objetivo equilibrar o balanço energético (CARRAZZA & MARCONDES, 1991). Em condições de restrição energética prolongada, para sobreviver, o organismo lança mão da ativação de vias como: a glicogenólise, a gliconeogênese e a lipólise. A musculatura esquelética, maior compartimento corporal de proteínas, e o tecido adiposo, principal reserva energética, são consumidos em função da manutenção

da homeostase (DOUGLAS, 2002; CARRAZZA & MARCONDES, 1991; MARCONDES, 1976).

Quando a baixa ingestão alimentar, com um balanço negativo, é mantida, o organismo tenta diminuir outros componentes da atividade metabólica. Ocorre então uma desaceleração do crescimento, tanto corporal quanto cerebral. Esta seria uma das mais importantes alterações funcionais devido ao aporte insuficiente de nutrientes às células (DOBBING, 1987). Em estudo sobre o desenvolvimento neuropsicomotor de lactentes mal-alimentados, foram encontradas classificações baixas, sobretudo na discriminação e capacidade de resposta a estímulos sensoriais, na habilidade para resolver problemas, na discriminação de objetos e na socialização (CHÁVEZ *et al.*, 1998). Ocorre perda da motivação para explorar o ambiente e, assim, um atraso na aquisição de certas habilidades cognitivas, independentemente de lesão cerebral (TANER & FINN-STEVENSON, 2002).

1.2 Desnutrição e Sistema Nervoso Central

Muitos estudos vêm sendo realizados no intuito de identificar aspectos do desenvolvimento do sistema nervoso que podem ser alterados pela nutrição (ROTTA *et al.*, 2003; MORGANE *et al.*, 2002; DAUNCEY & BICKNELL, 1999; HALES & BARKER, 1992).

A adequada maturação e otimização do uso do Sistema Nervoso Central (SNC) dependem essencialmente de três fatores críticos: genética do indivíduo,

estimulação ambiental e nutrição adequada (MORGANE *et al.* 2002; GALLER *et al.*, 1995; MARCONDES, 1976).

O estado nutricional caracteriza-se, portanto, como condição primordial ao desenvolvimento e organização do sistema nervoso e está diretamente relacionado à produção de energia e de nutrientes necessários ao desenvolvimento de estruturas celulares e dos vários sistemas metabólicos nele presentes, causando maiores prejuízos quanto mais precocemente se estabelecer a desnutrição (MORGANE *et al.*, 1992).

A maturação cerebral envolve uma série de estágios sobrepostos temporalmente que seguem uma seqüência precisa e diferem de região para região cerebral e mesmo dentro de uma região em particular, ocorrendo em épocas distintas nas diferentes espécies animais. Em roedores essa fase ocorre a partir da última semana gestacional, indo até o final do período de aleitamento e ocorrendo com maior intensidade no período pós-natal (MORGANE *et al.*, 2002; SCRIMSHAW & GORDON, 1968)

Nos seres humanos, a fase de maturação cerebral vai desde o último trimestre gestacional até os primeiros anos de vida (2 a 4 anos). Há relatos de que o período que vai até os 2 anos de idade, em humanos, é uma fase crítica para a privação alimentar, uma vez que, neste período, há um crescimento acelerado do corpo e o encéfalo alcança aproximadamente 80% do seu tamanho adulto; assim, há uma maior necessidade de nutrientes, onde a privação pode acarretar conseqüências devastadoras em estruturas encefálicas como hipocampo e cerebelo (BONATTO *et al.*, 2006; BROWN & POLLITT, 1996; POLLITT *et al.*, 1993; BRONZINO *et al.*, 1990, 1986; LAI & LEWIS, 1980; LAI *et al.* 1980). Nesta

fase, a neurogênese, a gliogênese e a migração neuronal acontecem com velocidade máxima, provocando um rápido aumento do peso cerebral. Por este motivo, esta fase é chamada de período de crescimento rápido do cérebro (também denominado período crítico), onde há uma vulnerabilidade aumentada a vários tipos de agressões, inclusive à desnutrição (DOBBING, 1968) (FIGURA 2).

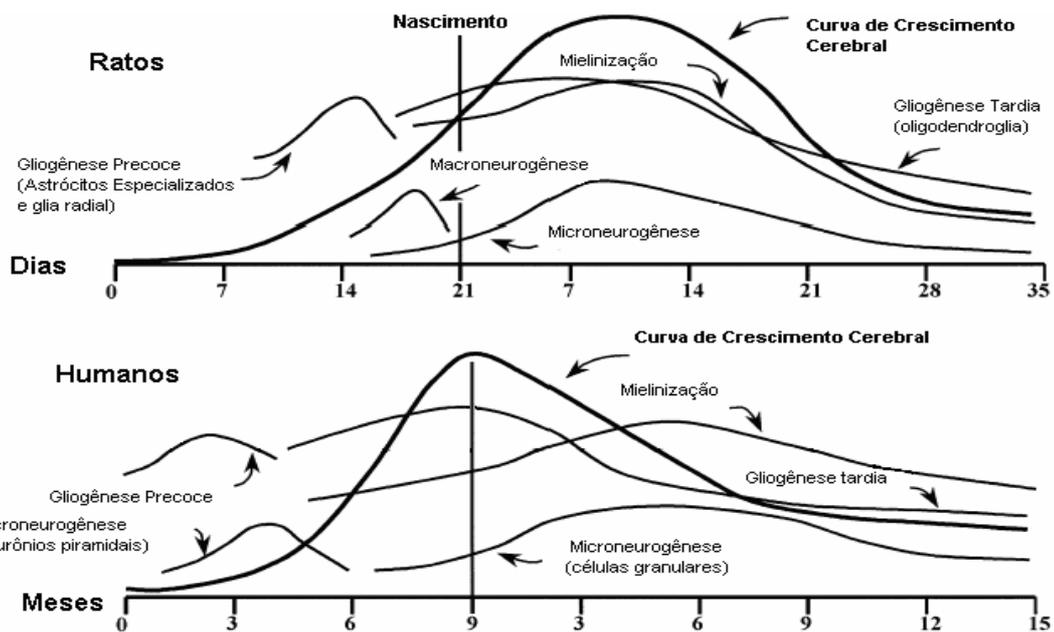


FIGURA 2 - Curva de velocidade, comparando índices relativos, duração e tempo do processo de desenvolvimento específicos no SNC de ratos e humanos. As curvas de rápido crescimento cerebral são sobrepostas em relação aos eventos relativos ao desenvolvimento do SNC. No humano, há aquisição de aproximadamente 27% do peso cerebral adulto ao nascimento, comparando a aproximadamente 12% do peso cerebral adulto visto em ratos ao nascimento. Fonte: Adaptado de Morgane *et al.*, 2002.

No transcorrer das etapas do crescimento dos animais, nas fases pré e pós-natal, os níveis de RNA, DNA e proteínas vão variar de acordo com os diferentes órgãos, em etapas diversas do seu desenvolvimento. Na fase inicial, há predominância da multiplicação celular ou hiperplasia, com altos níveis de DNA. Posteriormente, irá ocorrer tanto a multiplicação quanto o aumento do tamanho

celular (hipertrofia), que vem acompanhado por um aumento nos níveis protéicos. Finalmente, a fase de divisão celular termina, persistindo apenas a hipertrofia celular.

Animais submetidos à desnutrição apresentam diminuição do nível total de ácido desoxirribonucléico na formação hipocampal (LUKOYANOV & ANDRADE, 2000; LEWIS *et al.*, 1979), além da redução da quantidade de mielina (MORGANE *et al.*, 1992) e lipídeos (DOBBING, 1968). A desnutrição também afeta a fase de divisão celular, com conseqüente prolongamento do ciclo celular (MORGANE *et al.*, 1993).

1.3 Modelos de desnutrição

O termo “desnutrição” pode assumir distintos significados. Para Morgane e colaboradores (2002), o termo “subnutrição” (*undernutrition*) indica desnutrição energética (quantitativa), onde existe deficiência global de nutrientes. De outra forma, o termo “má nutrição” (*malnutrition*) implicaria em proporções desequilibradas de um ou mais nutrientes (qualitativa), referindo-se à sua deficiência ou excesso. O tipo de desnutrição, portanto, está relacionado à natureza da deficiência dos nutrientes, ou seja, se é uma deficiência protéica, calórica, vitamínica, de minerais, ou ainda uma combinação delas.

Diversos modelos são descritos na literatura a fim de induzir a má nutrição nos períodos gestacional e/ou lactacional: redução da oferta de proteína na dieta oferecida às mães, aumento do número de filhotes por ninhada, mamectomia parcial, rotação de exposição dos filhotes a fêmeas lactantes e não-lactantes,

dentre outros. O modelo mais utilizado é o de restrição de proteína da dieta das mães. A redução do nível de proteína na dieta oferecida às mães é caracterizada por uma restrição da quantidade total de nutrientes acessíveis aos filhotes (PASSOS *et al.*, 2000; PINE *et al.*, 1994).

Além da natureza da deficiência nutricional, outro fator de fundamental importância é a fase em que a desnutrição ocorre. A desnutrição limitada ao período pré-natal já é suficiente para provocar alterações na tanto na estrutura cerebral quanto no comportamento de ratos (MORGANE *et al.*, 1993). Porém, uma combinação de desnutrição pré e pós-natal parece ser mais deletéria, causando efeitos mais graves na proliferação de diferentes tipos de neurônios (macro e micro) ou células gliais (astroglia e oligodendroglia) (MORGANE *et al.*, 2002).

1.4 Desnutrição protéica

A desnutrição do tipo protéica se diferencia dos demais modelos pelo fato de a proteína ser um dos nutrientes mais importantes ao desenvolvimento do SNC, por possuir aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas estruturais, enzimas, neuropeptídeos e neurotransmissores (GALLER *et al.*, 1995). Quando a deficiência nutricional está presente desde o período pré-natal é também caracterizada como fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurológicas (DIOP *et al.*, 2003; HACKET & IYPE, 2001) e psiquiátricas (HOECK *et al.*, 1998; SUSSER *et al.*, 1996; SUSSER & LIN, 1992), tais como a esquizofrenia (PALMER *et al.*, 2004; WEISS & FELDON, 2001). Em modelos experimentais de desnutrição foram detectados danos aos sistemas de

glutamatérgicos e GABAérgicos de neurotransmissores (ROTTA *et al.*, 2003; STEIGER *et al.*, 2002), no mecanismo de fosforilação de proteínas da membrana sináptica (SINGH & SHANKAR, 1999), às conexões neuronais (ROTTA *et al.*, 2003; MORGANE *et al.*, 2002), e ainda alterações do estado oxidativo celular (FEOLI *et al.*, 2006a; BONATTO *et al.*, 2005).

Proteínas não atravessam a placenta em quantidades significativas, mas são essenciais para fornecer os aminoácidos para a síntese protéica fetal. A omissão de um simples aminoácido (metionina, triptofano, lisina, por exemplo) ao feto pode causar sérios prejuízos para o seu desenvolvimento encefálico (MORGANE *et al.*, 2002). Assim, a desnutrição protéica pré-natal causa danos no desenvolvimento cerebral, alterando parâmetros neuroanatômicos, neuroquímicos, neurofisiológicos e/ou funcionais (FEOLI *et al.*, 2006a, 2006b; FIACCO *et al.*, 2003; WOODALL *et al.*, 1996; GALLER *et al.*, 1995; LEVITSKY & STRUPP, 1995; POLLITT *et al.*, 1993).

Além disso, a proteína da dieta se caracteriza por ser uma importante fonte de aminoácidos essenciais que podem ser usados como antioxidantes intracelulares, e sua restrição pode levar a um aumento do dano oxidativo por diminuir as defesas antioxidantes dos tecidos (FEOLI *et al.*, 2006a; BONATTO *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2002).

1.5 Desnutrição e estresse oxidativo

Radicais livres são fisiologicamente gerados por sistemas biológicos durante o metabolismo e se caracterizam por possuir um elétron desemparelhado

em sua órbita mais externa, condição que favorece a recepção de elétrons de outras moléculas, o que os torna extremamente reativos. Seu excesso pode oxidar diretamente macromoléculas, causando peroxidação de lipídeos, destruição específica de proteínas e dano ao DNA. Destacam-se entre os radicais livres e as moléculas que dão origem a radicais livres, as espécies centradas no oxigênio: o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil (OH^\bullet), alcóxil (RO^-), peróxil (ROO^\bullet), óxido nítrico (NO), entre outros (HALLIWELL, 1992).

A fim de neutralizar os radicais livres, as células possuem antioxidantes citosólicos e de membrana. O sistema de defesa antioxidante conta com enzimas como a superóxido dismutase (SOD), que converte os radicais superóxido (O_2^-) em H_2O_2 ; a catalase (CAT) que capta o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o decompõe em oxigênio e água antes que ele possa formar radicais hidroxilas (mais reativos e tóxicos), e a glutathione peroxidase (GPx) que atua tanto no meio intracelular quanto extracelular em busca de moléculas de peróxido de hidrogênio que possam ter escapado da ação da catalase, em especial as derivadas da oxidação da membrana fosfolipídica. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a atividade do sistema antioxidante, acarretando em dano celular (HALLIWELL, 1992).

Feoli e colaboradores (2006a) relatam que tanto a desnutrição protéica pré quanto pós-natal aumentou o dano oxidativo em áreas como o córtex, hipocampo e cerebelo. Alguns estudos relacionam o estado oxidativo do tecido encefálico de ratos submetidos à desnutrição protéica (BONATTO *et al.*, 2006, 2005; EHRENBRINK *et al.*, 2006; FEOLI *et al.*, 2006a), devido à particularidade que este tecido apresenta à ação dos radicais livres por sua taxa de atividade metabólica,

alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, regiões ricas em concentração de ferro e moderados níveis de antioxidantes (GARCIA *et al.*, 2005; EVANS, 1993).

A capacidade de um órgão ou sistema em desempenhar sua função depende da distribuição do fluxo sanguíneo, do fornecimento de oxigênio e do aporte de substâncias nutritivas adequadas (MADI & CAMPOS, 1975).

A supressão de nutrientes importantes para o desenvolvimento e a manutenção do tecido cerebral determina um vasto conjunto de alterações induzindo o surgimento de substratos anatômicos específicos nos diferentes tipos de estados de desnutrição (MONTANHA-ROJAS *et al.*, 2005). Em relação ao tecido nervoso, mudanças histológicas em decorrência da desnutrição manifestaram-se através de diminuição da densidade neuronal e glial no córtex cerebral e cerebelo (DOBBING & HOPEWELL, 1971), diminuição de espinhos dendríticos no córtex cingulado e hipocampo de animais desnutridos (GARCIA-RUIZ *et al.*, 1993, SCHONHEIT & HAENSEL, 1984).

Animais desnutridos apresentam padrão de resposta alterado em diferentes testes comportamentais que se manifestam através do aumento da latência para encontrar seus ninhos (TONKISS *et al.*, 1996; GALLER *et al.*, 1994), comprometimento da interação social em ratos jovens (ALMEIDA *et al.* 1996), prejuízo na memória espacial em ratos adultos (BEDI, 1992; CASTRO *et al.*, 1989; GOODLET *et al.*, 1986), menor frequência de transição no teste claro-escuro (BRIONI & ORSINGHER, 1988), reatividade aumentada em situações de natureza aversiva e diminuição da latência de resposta para estímulos dolorosos (LYNCH, 1976, SMART *et al.*, 1973).

1.6 Desnutrição protéica e asfixia perinatal

Merece atenção o fato que, ocorrendo durante a gestação, a desnutrição protéica é fator determinante de retardo no desenvolvimento fetal (GALDINO, 2001; MELO & CURY, 1988; ANTONOV, 1947; SMITH, 1947) além de acarretar elevadas proporções de recém-nascidos de baixo peso e alta incidência de abortos naturais, natimortos e morbidades no período perinatal (TOMKINS, 2001; LIVERPOOL, 1990; DIAZ DEL CASTILLO, 1975).

Em humanos, o recém-nascido de baixo peso ao nascer é aquele definido com peso inferior a 2500g, sendo ou não prematuro, apresentando mais anormalidades de desenvolvimento, sendo propensos a dificuldades comportamentais, cognitivas e de desempenho escolar, assim como menor crescimento físico (DAMMANN *et al.*, 1996; WERNER, 1986). Isto ocorre ainda com maior frequência e maiores repercussões se houver, simultaneamente, prematuridade, peso ao nascer abaixo de 1500g e complicações neonatais, como a hemorragia intracraniana e a asfixia perinatal (LAUCHT *et al.*, 1997).

Há uma importante correlação entre a desnutrição ocorrida no período gestacional e a asfixia perinatal, pois esta continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade no período neonatal e a causa mais importante de dano neurológico ao recém-nascido. Estimativas da Organização Mundial de Saúde indicam que dos 37% de casos de mortalidade infantil antes dos 5 anos de idade, 23% são relacionados à asfixia perinatal (DURAN *et al.*, 2007).

Quando tomadas em conjunto, o baixo peso aos nascer e a asfixia perinatal correspondem a aproximadamente 54% do total de óbitos em crianças até os 5 anos de idade (BLACK *et al.*, 2008). Estatísticas sugerem uma incidência de asfixia em 2-4 por 1000 nascimentos a termo. No Brasil, estima-se que a prevalência de asfixia neonatal seja de aproximadamente 2% dos nascidos vivos (SOUZA, 2003). Dos sobreviventes, mais de 25% irão exibir incapacidades neuropsicológicas permanentes, incluindo: retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia e dificuldades na aprendizagem (WEITZDOERFER *et al.*, 2004, VANNUCCI & HAGBERG, 2004).

A asfixia fetal ocorre primariamente como resultado de troca placentária prejudicada, sendo que o fluxo sangüíneo uterino prejudicado, a hipóxia materna, a insuficiência placentária e a compressão do cordão umbilical, entre outras causas, podem interferir com a transferência de substratos e levar à asfixia fetal (JENSEN, 2002; WILLIAMS & LUCCI, 1990).

1.7 Encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI)

O termo encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) refere-se às alterações neurológicas em recém-nascidos decorrentes da hipóxia perinatal (SARNAT & SARNAT, 1976), vindo a ser uma complicação imediata à asfixia intrauterina grave e causadora de transtornos de desenvolvimento, comportamento e de deficiência mental (AMATO & DONATI, 2000, BADAWI *et al.*, 1998).

A hipóxia-isquemia decorre de uma diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos e pode se desenvolver de duas maneiras: uma situação de hipoxemia, que

é a diminuição da quantidade de oxigênio circulante nos tecidos, e de uma isquemia, diminuição na quantidade de sangue que perfunde os tecidos (BERGER & GARNIER, 1999, ENGIDAWORK *et al.*, 1997).

O dano cerebral hipóxico-isquêmico é um processo evolutivo, que se inicia durante o insulto e estende-se no período de recuperação após a ressuscitação (lesão por reperfusão). Os achados clínicos da encefalopatia hipóxico-isquêmica irão variar dependendo do período da lesão, da duração do insulto e dos mecanismos fetais de adaptação. Complicações sistêmicas da asfixia neonatal freqüentemente ocorrem, incluindo alterações cardiovasculares, respiratórias, metabólicas e renais.

No entanto, o SNC é a estrutura mais afetada (VANUCCI & VANUCCI, 1997). O funcionamento adequado dos neurônios depende da oferta apropriada de oxigênio e glicose para a produção de energia, e os mecanismos de despolarização e repolarização (que possuem alta demanda energética) constituem a base do funcionamento cerebral.

Durante a fase de isquemia, ocorre diminuição do aporte de oxigênio para o tecido acometido, levando à inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e à queda da produção de trifosfato de adenosina (ATP). No entanto, o consumo do estoque de ATP continuaria, sendo este composto degradado a adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP). Com a exaustão das reservas energéticas durante a hipóxia, ocorre falência nos mecanismos de manutenção dos potenciais da membrana. Como a glicólise anaeróbica é insuficiente para manter a produção de ATP, não há energia para manter as funções cerebrais,

ocorrendo desativação das bombas iônicas, despolarização das membranas e abertura dos canais iônicos dependentes de voltagem (DUGAN & CHOI, 1999).

Há uma diminuição da atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase resultando em inchaço celular e edema citotóxico. Também ocorre uma despolarização generalizada nos neurônios e com a perda dos potenciais de membrana, o Ca^{++} flui para o meio intracelular, acarretando liberação de neurotransmissores excitatórios, em especial o glutamato. O glutamato, então, ativa os receptores NMDA, AMPA, e cainato, resultando no influxo de Na^+ e Ca^{++} para dentro dos neurônios pós-sinápticos, o que impede a recaptação de glutamato da fenda sináptica. A excitotoxicidade, como mecanismo de dano neuronal, é desencadeada a partir do desequilíbrio entre a liberação e a recaptação de glutamato. Como o mecanismo de recaptação do glutamato (regulado principalmente pelos astrócitos) é dependente de ATP, sofre grande prejuízo com a falência energética decorrente do insulto hipóxico-isquêmico (MAGISTRETTI *et al.*, 1999).

O acúmulo de cálcio intracelular desencadeia uma série de reações químicas que apresentam efeito cascata, ocasionando a morte celular. Dentre essas ações, destaca-se a ativação de proteases, endonucleases e fosfolipases, as quais, atuando sobre lipídeos da membrana plasmática, levam à formação excessiva de ácidos graxos livres e ácido araquidônico.

Possíveis mecanismos celulares responsáveis pela lesão hipóxico-isquêmica também envolvem a ativação de caspases (em particular a caspase-3), uma família de enzimas ativadas durante o episódio hipóxico e que atua dando início e executando a apoptose neuronal (ROSSITER *et al.*, 2002; TELEP, 2002;

LOW *et al.*, 2002), além de processos inflamatórios em decorrência da ativação de citocinas (polipeptídeos mediadores de resposta inflamatória).

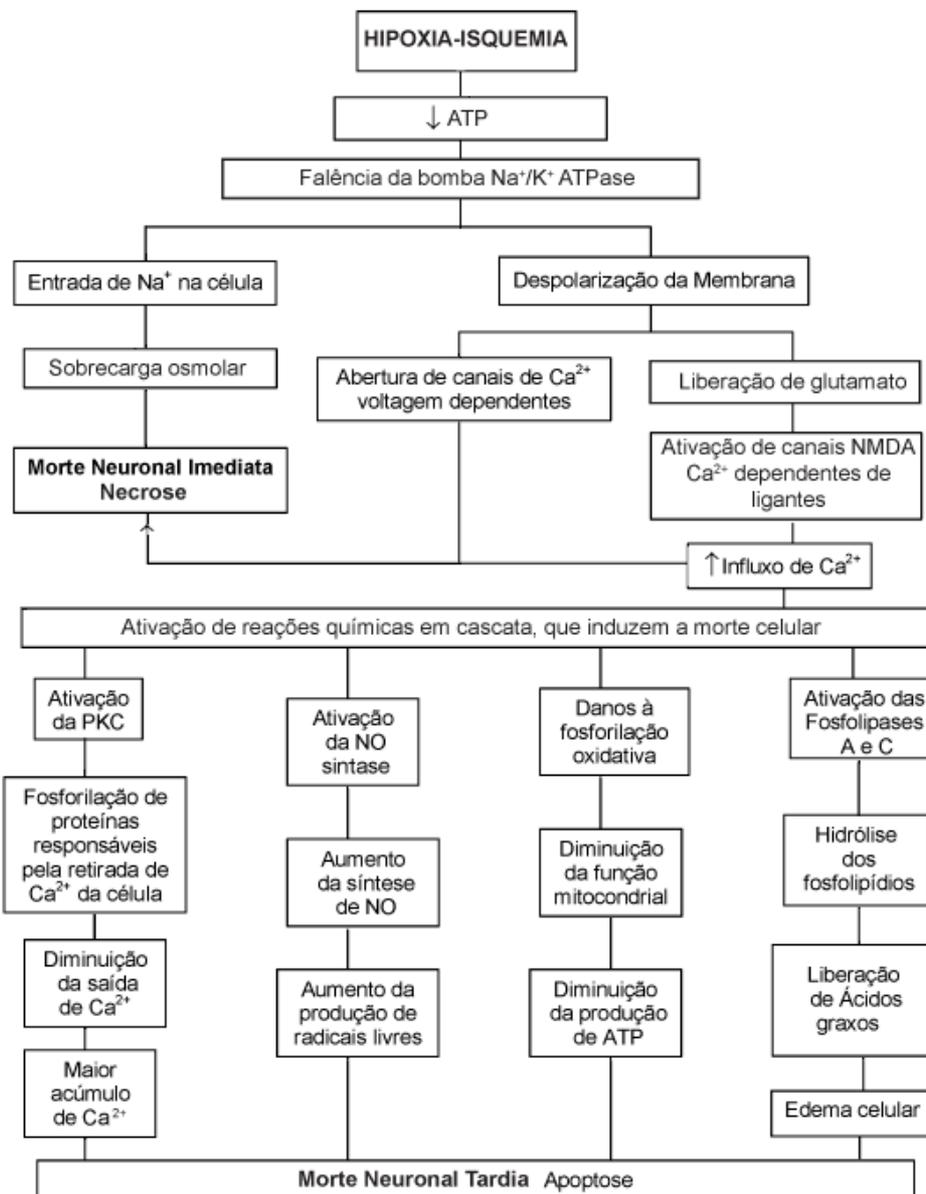


FIGURA 3 - Esquema ilustrativo da fisiopatologia da encefalopatia hipóxico-isquêmica (modificado de ARAÚJO *et al.*, 2008).

A geração de radicais livres durante a isquemia-reperusão ocorre por vários mecanismos, incluindo a atividade da óxido nítrico sintase (NOS), da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, do metabolismo do ácido araquidônico e atividade da xantina oxidase (DUGAN & CHOI, 1999) que resultam em estresse oxidativo (MCLEAN & FERRIERO, 2004).

Dada a complexidade da patologia, torna-se importante o desenvolvimento e aperfeiçoamento de modelos experimentais para o estudo do dano hipóxico-isquêmico em animais, simulando as condições patológicas que ocorrem durante a gestação humana (DUGAN & CHOI, 1999), a fim de contribuir para o conhecimento dos mecanismos de lesão, melhorar a compreensão sobre a evolução da patologia e os seus desfechos e fornecer um modelo no qual se desenvolvam e testem estratégias terapêuticas. Ratos e camundongos são os animais mais comumente usados em modelos de asfixia perinatal (YAGER, 2004).

Dentre os modelos descritos na literatura, o modelo experimental de anóxia-isquemia desenvolvido por Levine (1960) e posteriormente modificado por Rice e colaboradores (1981) tem sido utilizado com sucesso no intuito de reproduzir o insulto hipóxico-isquêmico ocorrido em humanos. É vantajoso por apresentar alta reprodutibilidade (WALTON *et al.*, 1999), baixo custo, baixa mortalidade, produz dano em 90% dos ratos e permite recuperação do fluxo sanguíneo, mesmo com a oclusão da carótida, produzindo lesões no hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida nas regiões do córtex cerebral, substância branca periventricular e subcortical, estriado (núcleos da base) e hipocampo (PEREIRA *et al.*, 2007; HOSSAIN, 2005; VANUCCI & VANUCCI, 2005; ARTENI *et al.*, 2003).

Estudos realizados previamente em nosso laboratório demonstraram que ratos com esse tipo de lesão apresentam déficits cognitivos revelados em testes de memória espacial e aversiva, além de induzir a estresse oxidativo nas estruturas citadas (PEREIRA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2004; ARTENI *et al.*, 2003; ALSCHER, 2002).

Considerando-se o grande impacto do dano neurológico causado pela encefalopatia hipóxico-isquêmica na vida do indivíduo e a alta incidência de desnutrição na população, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos enfocando principalmente suas conseqüências e possíveis tratamentos. Com base nas informações acerca das duas patologias, de seus mecanismos fisiopatológicos, trabalhamos com a hipótese de que, ao alterar o metabolismo encefálico de forma acentuada, a desnutrição protéica possa alterar as conseqüências da encefalopatia hipóxico-isquêmica em parâmetros bioquímicos, comportamentais e morfológicos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi investigar a influência da desnutrição protéica pré-natal e lactacional sobre o estado oxidativo, o comportamento e o dano cerebral causado pelo insulto hipóxico-isquêmico cerebral neonatal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Quantificar os níveis de radicais livres formados através de ensaio de 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF), níveis de peroxidação lipídica pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), quantificar os resíduos do aminoácido triptofano presentes nas amostras teciduais e verificar perturbações na homeostase dos sistemas antioxidantes endógenos através da quantificação dos tióis totais presentes nas amostras de hipocampo, estriado, cerebelo e hipotálamo aos 7 dias de vida.

2.2.2 Verificar possíveis alterações no sistema motor, através dos testes de preensão palmar, geotaxia negativa, reflexo de endireitamento aos 7 dias de vida e dos testes de *Rota-rod* e atividade exploratória dos animais através do teste do campo aberto aos 60 dias.

2.2.3 Verificar possíveis alterações sensoriais e cognitivas através da avaliação do comportamento olfatório dos animais aos 7 dias e do teste de esquiva inibitória aos 60 dias de vida dos animais.

2.2.4 Mensurar o dano encefálico causado pela associação entre a desnutrição protéica gestacional-lactacional e a encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal, medido através do peso encefálico aos 60 dias de vida dos animais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas ninhadas de ratos da espécie *Rattus Norvegicus*, linhagem Wistar, provenientes do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Receberam ração adaptada ao grupo experimental ao qual pertenciam e água *ad libitum*, sendo mantidos em caixas plásticas (390 x 320 x 170 mm) recoberta por maravalha e ambiente climatizado ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$). O ciclo claro/escuro utilizado foi de 12 horas.

O protocolo experimental foi desenvolvido de acordo com as diretrizes do Comitê de Cuidado e Uso de Pesquisa com Animais Experimentais, Escola de Medicina Veterinária e Ciência Animal da Universidade de São Paulo, Brasil.

3.2 Desenho experimental

Os experimentos foram divididos em duas etapas: em um primeiro momento as fêmeas prenhas foram submetidas às dietas normonutrida e desnutrida durante o período gestacional e lactacional, sendo suas proles, aos sete dias de vida, submetidas ao procedimento de hipóxia-isquemia. As ninhadas, a partir do 7º dia pós-natal (PND7), foram distribuídas nos seguintes grupos experimentais: controle normonutrido (SHAMNN), isquêmico normonutrido (INN), hipóxico normonutrido (HNN), grupo hipóxico-isquêmico normonutrido (HINN), controle desnutrido (SHAMDN), grupo isquêmico desnutrido (IDN), grupo hipóxico

desnutrido (HDN) e grupo hipóxico-isquêmico hipoprotéico (HIDN). Os grupos SHAMNN e SHAMDN foram submetidos aos procedimentos de anestesia e incisão cirúrgica, sem a oclusão da artéria carótida. Os animais foram então testados quanto à capacidade de reconhecer o odor de seus ninhos e sacrificados para as análises bioquímicas (FIGURA 4).

Em um segundo momento, novos animais foram submetidos ao processo de acasalamento e as ratas, a partir do primeiro dia da prenhez, submetidas às dietas normonutrida e desnutrida, também durante o período gestacional e lactaciona . Os filhotes foram expostos à hipóxia-isquemia, porém nesta etapa os animais foram testados quanto ao desenvolvimento motor aos 7 dias de vida. Aos 60 dias foram novamente testados quanto ao desenvolvimento motor, atividade exploratória, ansiedade, memória e sacrificados para análise morfológica.

O acompanhamento ponderal das fêmeas foi feito através do período gestacional e sua verificação ocorreu no 1º, 4º, 7º, 14º, 17º e 21º dias gestacionais. As ninhadas foram pesadas no 1º, 4º e 7º dias pós-natais (animais utilizados nos ensaios bioquímicos); além destas pesagens, nos animais avaliados aos 60 dias foram realizadas pesagens no 21º (dia do desmame), 30º e 60º dias.

O tamanho das ninhadas foi ajustado para possuir entre 7 e 8 filhotes por mãe no primeiro dia pós-natal (PND1). Na tentativa de minimizar ao máximo os animais a serem utilizados, optamos pela utilização de ratos machos e fêmeas neste estudo. Foi utilizado um número de 7 a 11 animais por grupo experimental na idade adulta e verificado um índice de mortalidade de 19,73% dos animais após o procedimento cirúrgico.

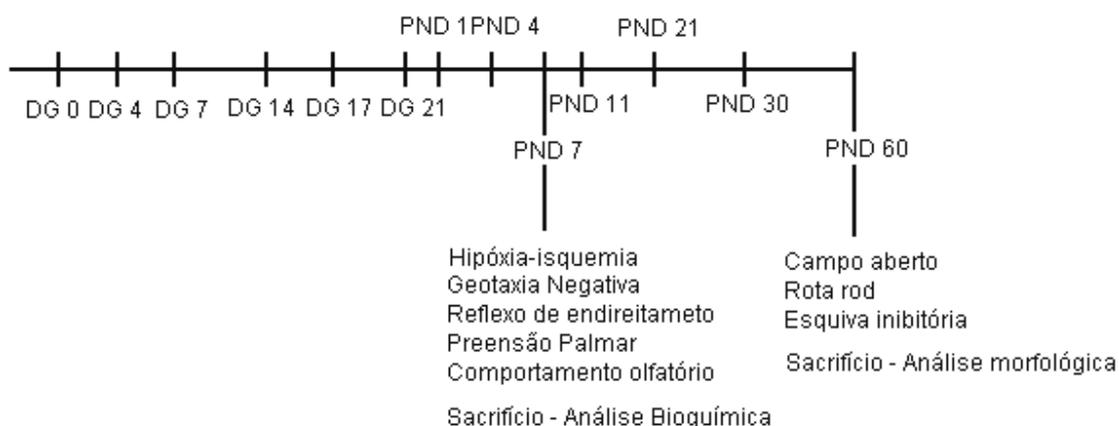


FIGURA 4 - Esquema ilustrativo do desenho experimental utilizado. DG: dia gestacional, PND: dia pós-natal.

3.3 Dietas

Foi utilizado o modelo de desnutrição pré-natal e lactacional caracterizado pela restrição do conteúdo protéico a 7% na dieta das mães nos grupos desnutridos, sendo os grupos normonutridos mantidos com 25% de proteína na dieta (FEOLI *et al.*, 2006a, 2006b). Duas fêmeas nulíparas com idade superior a 60 dias e um macho eram acondicionados na mesma caixa para que fosse realizado o acasalamento (FEOLI *et al.*, 2006a). Confirmada a prenhez através da coleta do esfregaço vaginal, era ofertada a dieta correspondente às fêmeas pertencentes a cada grupo experimental (normoprotéica ou hipoprotéica) a partir do primeiro dia gestacional (DG0), sendo mantida durante todo este período e o

lactacional, até o dia do desmame, onde a prole passou a receber ração padrão do biotério.

A porcentagem de carboidrato foi aumentada na dieta com deficiência de proteína para a obtenção de dietas isocalóricas (FEOLI *et al.*, 2006a, 2006b) sendo suplementadas com 0.15% de L-metionina (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) na proteína. Quanto aos demais nutrientes, as porcentagens foram as mesmas para ambas as dietas (7% e 25% de proteína). As composições das misturas de sais e vitaminas estão de acordo com a Associação Oficial de Químicos Analíticos (Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 1980). A composição nutricional das dietas está expressa na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional das dietas (g/kg de dieta):

Componente	Proteína da dieta	
	25%	7%
Proteína de soja (92%) ^a	271,4	76
Sais Minerais ^b	40	40
Vitaminas ^c	10	10
Fibras	10	10
Amido	512,5	707,5
Óleo de soja	150	150

^a Proteína de soja (Solae, São Paulo, Brasil), pureza de 92% suplementada com 0,15% de L-metionina.

^b Mistura de minerais mg/100g de ração: NaCl, 557; KCl, 3,2; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄ . 7H₂O, 108; MnSO₄ . H₂O, 16; ZnSO₄ . 7H₂O, 2,2; CuSO₄ . 5H₂O, 1,9; CaCl₂ . 6H₂O, 0,09.

^c Mistura de vitaminas (Roche, São Paulo, Brasil) mg/100g de ração: vitamina A, 4; vitamina D, 0,5; vitamina E, 10; menadiona, 0,5; colina, 200; ácido p-aminobenzóico (PABA), 10; inositol, 10; niacina, 4; ácido pantotênico, 4; riboflavina, 0,8; tiamina, 0,5; piridoxina, 0,5; ácido fólico, 0,2; biotina, 0,04; vitamina B12, 0,003.

O valor energético para ambas as dietas é de 4,3 kcal/g.

3.4 Hipóxia-isquemia

Foi utilizado o modelo experimental baseado na preparação de Levine (1960), modificado por Rice e colaboradores (1981) para ratos neonatos. O modelo consiste na associação da ligação da artéria carótida comum direita com a exposição a uma atmosfera hipóxica buscando produzir um dano unilateral no encéfalo do rato.

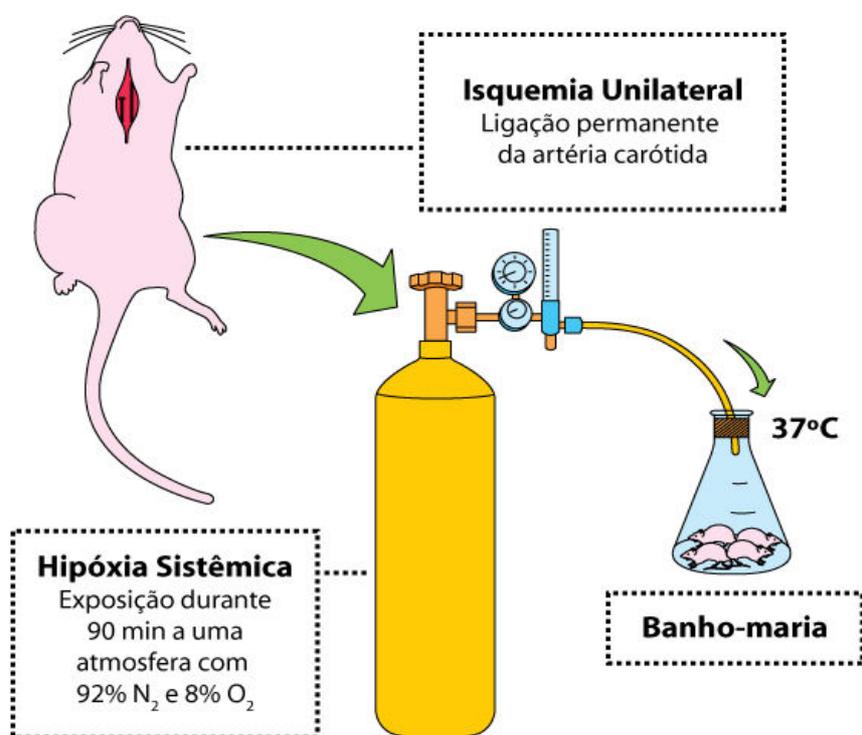


Figura 5 - Procedimento de Levine, modificado por Rice, que se utiliza da combinação de hipóxia e isquemia.

Os animais, aos 7 dias de vida, foram anestesiados com halotano 2-4% e submetidos ao procedimento cirúrgico. O procedimento era iniciado através uma incisão na linha média da face anterior da região cervical, sendo então a artéria carótida comum direita identificada, isolada de estruturas adjacentes, e ocluída

com fio cirúrgico de seda 4.0 através de dois nós. Findo este procedimento, os animais permaneceram em recuperação sob temperatura controlada durante 15 minutos antes de serem devolvidos às caixas moradia, onde permaneceram por um intervalo de 2,5 horas junto às mães. Por fim, em grupos de cinco, os animais eram gentilmente colocados em uma câmara (1500 ml) e expostos à atmosfera hipóxica (8% de oxigênio e 92 % de nitrogênio, com fluxo de 5l/min) durante 90 min. A câmara de hipóxia permanecia parcialmente submersa em banho-maria a 37°C para manter a temperatura corporal dos ratos lactentes dentro de limites fisiológicos. Ao final da hipóxia, os animais eram retirados da câmara e devolvidos à sua caixa de origem, junto às mães (ARTENI *et al.*, 2003).

3.5 Análise Bioquímica

Logo após a realização do teste olfatório, os animais foram sacrificados por decapitação no intervalo de tempo de 4hs após o procedimento cirúrgico em sala separada dos demais animais de experimentação. As estruturas de interesse, hipocampo, estriado, cerebelo e hipotálamo foram dissecadas, pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70°C até a realização dos ensaios bioquímicos.

3.5.1 Preparação dos Homogeneizados

Para a realização dos ensaios bioquímicos, as amostras foram homogeneizadas em 10 vol de solução tampão fosfato resfriado (0,1M, pH 7,4)

contendo 140mM de KCl, 1mM de ácido etilenodiaminotetracético e 1mM de fenil metil sulfonil fluoreto. O homogeneizado foi centrifugado a 960g por 10 minutos e o sobrenadante utilizado. Todos os passos foram realizados a 4°C. As estruturas foram escolhidas pelo fato de exibirem maior vulnerabilidade ao insulto oxidativo, de acordo com diversos autores (IKEDA *et al.*, 2001; BERGER & GARNIER, 1999; DUGAN & CHOI, 1999; WALTON *et al.*, 1999; VANUCCI & VANUCCI, 1997).

3.5.2 Ensaio de 2',7' diclorofluoresceína (DCF)

A quantificação da formação de radicais livres foi avaliada com base na modificação oxidativa do “probe” exógeno, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (SIQUEIRA *et al.*, 2005). Parte da amostra do tecido foi incubada com DCFH-DA (100µM) a 37°C durante 30min. A formação do derivado fluorescente oxidado (DCF) foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência (Hitachi F-2000; Hitachi, Tokyo, Japan). A formação de espécies reativas de oxigênio foi quantificada utilizando-se uma curva DCF padrão e os resultados estão expressos em porcentagem (%) do grupo SHAMNN.

3.5.3 Ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)

Os níveis de peroxidação lipídica foram avaliados pelo método de detecção indireta de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) descrito por Yagi (1998), que consiste na incubação de amostras do tecido com 10% de ácido

tricloroacético (TCA) e 0,67% de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura é aquecida durante 30 min em banho-maria. Após isso, n-butanol é acrescentado à mistura e então esta foi centrifugada. A fase orgânica foi então coletada para obter-se a medida da fluorescência (Hitachi F-2000; Hitachi, Tokyo, Japan) nos comprimentos de onda de 515nm para excitação e 553nm para emissão. 1,1,3,3-tetrametoxipropano, que é convertido em malondialdeído (MDA), foi utilizado como padrão. Os resultados estão expressos em porcentagem (%) do grupo SHAMNN.

3.5.4 Determinação dos tióis celulares

Os tióis celulares, como a glutathiona e tióis protéicos foram determinados utilizando o reagente de Ellman, o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) (ELLMAN, 1959). Alíquotas das amostras foram incubadas com DTNB em uma concentração final de 100mM durante 15 minutos no escuro. A absorbância da reação da mistura foi medida no comprimento de onda de 412 nm (KHAJURIA *et al.*, 1999). Os resultados estão expressos em porcentagem (%) do grupo SHAMNN.

3.5.5 Quantificação de resíduos de triptofano (TRI)

O conteúdo de resíduos de triptofano presente nas amostras foi determinado por fluorescência (Hitachi F-2000; Hitachi, Tokyo, Japan) nos comprimentos de onda de excitação de 280nm e emissão de 345nm. Foi adicionado dodecilsulfato de sódio a uma alíquota das amostras em uma

concentração final de 0,1%. Os resultados estão expressos como porcentagem (%) do grupo SHAMNN (FEOLI, 2006a).

3.5.6 Determinação da concentração de proteínas

Os níveis de proteína foram determinados segundo o método de Bradford (1976). Foi utilizado o corante Coomassie Brilliant Blue, que ao ligar-se às proteínas, tem a sua absorbância alterada de 465nm para 595nm (comprimento de onda de leitura no espectrofotômetro). Foi utilizada albumina sérica bovina como padrão na concentração de 1mg/mL.

3.6 Análise Comportamental

Previamente ao procedimento cirúrgico (PND7), os animais foram separados das mães durante o tempo de realização dos testes motores (geotaxia negativa, reflexo de endireitamento e preensão palmar) e de comportamento olfatório. Logo após, eram retornados às caixas-moradia. Realizado o procedimento de hipóxia-isquemia (PND7) os animais eram re-testados 3,5 horas após o fim da hipóxia, período em que ficavam na caixa com as mães. Nos animais avaliados na fase adulta as alterações motoras foram determinadas pelos mesmos testes (PND7) e pelo teste de *Rota-rod* (PND60).

3.6.1 Geotaxia negativa

Os animais foram submetidos a um plano inclinado de 30° com a face virada em direção ao solo. Foi medida a latência do animal em adotar uma posição contrária, ou seja, virar-se 180° (direção cefálica contrária ao solo). Realizado o movimento, foi dada ao animal a resposta (+), caso contrário (-). O tempo máximo de teste foi 60 segundos (adaptado de KUNKO *et al.*, 1996).

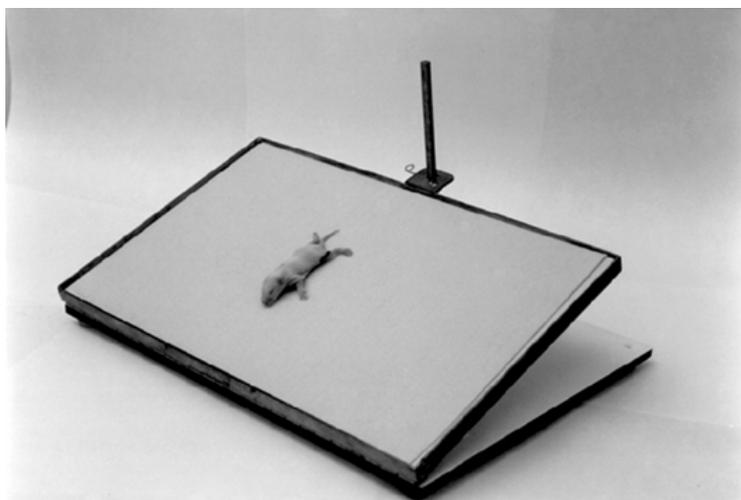


FIGURA 6 - Ilustração do teste de geotaxia negativa (Fonte: Groenink *et al.*, 2008).

3.6.2 Preensão palmar

Os animais foram seguros de forma que ficassem suspensos e com as patas dianteiras livres. O teste foi realizado na pata dianteira direita e consistiu em, ao se encostar um clipe na palma da pata do animal, ele realizar o movimento de preensão. Realizado o movimento foi dada ao animal a resposta (+), caso contrário (-). O tempo máximo de teste foi de 15 segundos (adaptado de KUNKO *et al.*, 1996).

3.6.3 Reflexo de endireitamento

Os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma superfície, onde logo após, foi medida a latência para que ele assumisse a posição de decúbito ventral com as 4 patas apoiadas sobre o solo. A latência máxima foi de 15 segundos. Realizado o movimento, foi dada ao animal a resposta (+), caso contrário (-) (adaptado de KUNKO *et al.*, 1996).

3.6.4 Rota-rod

Na idade adulta, a avaliação motora foi realizada por meio do teste de *Rota-rod*, metodologia descrita por LIU e colaboradores (2007). O aparelho de *Rota Rod* (Insight[®], 540 x 540 x 420 mm) (FIGURA 7) consiste de um cilindro distante 20cm da superfície da mesa, movido por um motor e regulado de modo que a velocidade máxima chegue a 37rpm. Para manter-se sobre cilindro giratório, o animal necessita locomover-se, de modo que a capacidade locomotora pode ser então quantificada cronometrando-se o tempo de permanência do rato sobre o cilindro. Os animais foram avaliados aos 60 dias de vida. Para que ocorresse habituação e aprendizado, no primeiro dia era realizado o treino dos animais e no dia seguinte, a avaliação da função motora. O número máximo de quedas permitidas foi 4 no treino. No teste os animais não eram auxiliados. O tempo limite do teste foi de 300 segundos.



FIGURA 7 - Foto do aparelho utilizado no teste de *Rota-rod*.

3.6.5 Campo aberto

Aos 60 dias de vida os animais foram colocados na arena circular do campo aberto, dividida em áreas e cercada por uma parede de 40 cm de altura. O piso do aparelho é dividido por meio de linhas em raios e círculos concêntricos de maneira a formar 25 figuras geométricas semelhantes que possuem relativamente a mesma área, conforme FIGURA 8. Cada figura geométrica é considerada uma "região" onde foram observadas, durante 5 minutos, diferentes variáveis comportamentais como: a latência para iniciar a locomoção, cruzamentos (número de linhas atravessadas), e respostas de orientação vertical (levantar e sustentar o corpo em duas patas) (PIETÁ DIAS *et al.*, 2007). Os animais preferem a periferia ao centro do aparelho, normalmente ambulando em contato com as paredes, ou seja, apresentam tigmotaxia. A tigmotaxia parece estar relacionada com a

ansiedade no campo aberto (CHOLERIS *et al.*, 2001). A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente novo (MONTGOMERY, 1955).

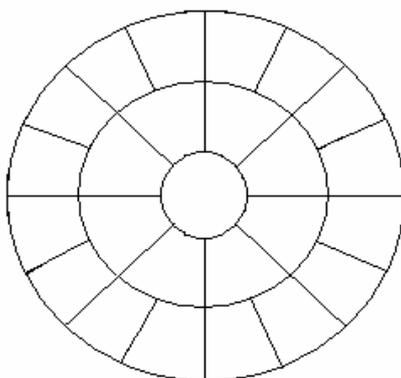


FIGURA 8 - Ilustração da arena do teste do Campo aberto.

3.6.6 Teste olfatório

O teste foi realizado em uma caixa acrílica retangular transparente (400x320x200)mm, onde o animal é exposto de um dos lados à maravalha da caixa-moradia e do outro à maravalha limpa. Foi verificada a latência para direcionar-se à maravalha da caixa-moradia ou à maravalha fresca (quando recebia o valor máximo do teste). Os animais eram colocados na linha média entre as maravalhas e virados com a região cefálica em direção a um dos lados da caixa não ocupados por maravalha. O tempo máximo destinado ao teste foi de 300 segundos. O teste foi realizado anteriormente ao procedimento cirúrgico e 3,5 horas após o mesmo (adaptado de FAVERO *et al.*, 2006).



FIGURA 9 - Foto ilustrativa do teste de comportamento olfatório.

3.6.7 Esquiva inibitória

Os animais foram submetidos a uma caixa onde há uma plataforma elevada e uma outra região onde há uma grade de barras de bronze que permite a possibilidade da aplicação de um choque elétrico (500x250x250)mm. A latência de descida da plataforma foi anotada no treino. Ao descer da plataforma e encostar as 4 patas na grade, o animal recebe choques de 0,5 mA/2s. Após 24 horas, a retenção é avaliada, onde a latência de descida da plataforma é tomada como índice de memória (ARTENI *et al.*, 2002). O tempo limite do teste foi de 180 segundos.

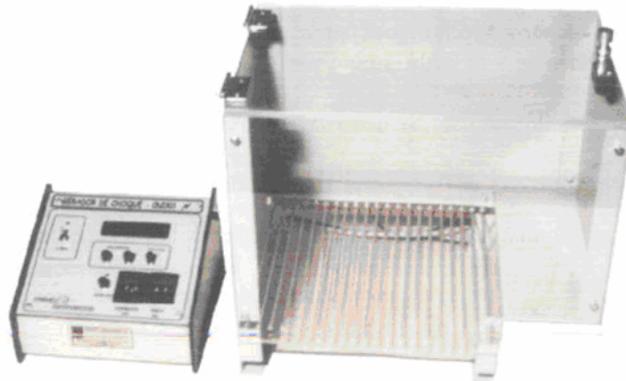


FIGURA 10 - Foto do aparelho utilizado no teste de esquiva inibitória.

3.7 Análise morfológica

Para a realização da análise histológica, os ratos foram previamente perfundidos e preparados seus encéfalos. Os animais foram anestesiados com solução de hidrato de cloral (20%, 10 ml/kg) via intraperitoneal. Foi então realizada a toracotomia, expondo o coração e os grandes vasos para a cateterização da aorta ascendente, através do coração. A via de perfusão foi transcardíaca e para a cateterização da aorta foi utilizado um cateter metálico introduzido através do *apex cordis* até início da aorta ascendente. O cateter foi conectado a uma bomba de perfusão peristáltica para a administração das soluções de 150 ml de salina (NaCl 0,9%) e, após, 150 ml de formaldeído 4,0%. Junto à solução salina foi administrado heparina a fim de evitar a formação de coágulos no espaço

intravascular. A aorta descendente e a auriculotomia foram clampeadas a fim de permitir a otimização da perfusão e a drenagem das soluções administradas.

Após a perfusão, os encéfalos foram removidos, avaliados quanto às lesões macroscópicas presentes nas amostras coletadas, pesados e armazenados na mesma solução de fixação. O dano encefálico foi definido como a porcentagem de dano ao hemisfério cerebral direito (ipsilateral à lesão) com relação ao hemisfério cerebral esquerdo, medido através do peso através da fórmula (peso do hemisfério esquerdo – peso do hemisfério direito) / peso do hemisfério esquerdo x 100.

3.8 Análise estatística

Os dados paramétricos (peso das ratas-mães, peso dos filhotes no período lactacional e após o desmame, parâmetros bioquímicos, o teste de comportamento olfatório, dados do campo aberto, *Rota-Rod*, peso encefálico e dano encefálico), foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações.

Para análise dos resultados esquivas inibitórias utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney para múltiplas comparações. Os resultados estão expressos pela mediana e intervalo interquartil (25 e 75%).

Os dados referentes aos testes motores (geotaxia negativa, reflexo de endireitamento e preensão palmar) foram analisados pelo teste Qui-quadrado.

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através de software estatístico SPSS versão 15.0.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliações ponderais

Os dados referentes ao ganho de peso corporal das ratas-mães no período gestacional estão apresentados na FIGURA 11. Ao longo da gestação houve efeito significativo do fator dia gestacional (DG), verificado pelo teste de ANOVA de medidas repetidas ($F(1,10)= 143,15$, $p<0,01$). Não foi verificada diferença significativa entre os grupos normoalimentado e desnutrido.

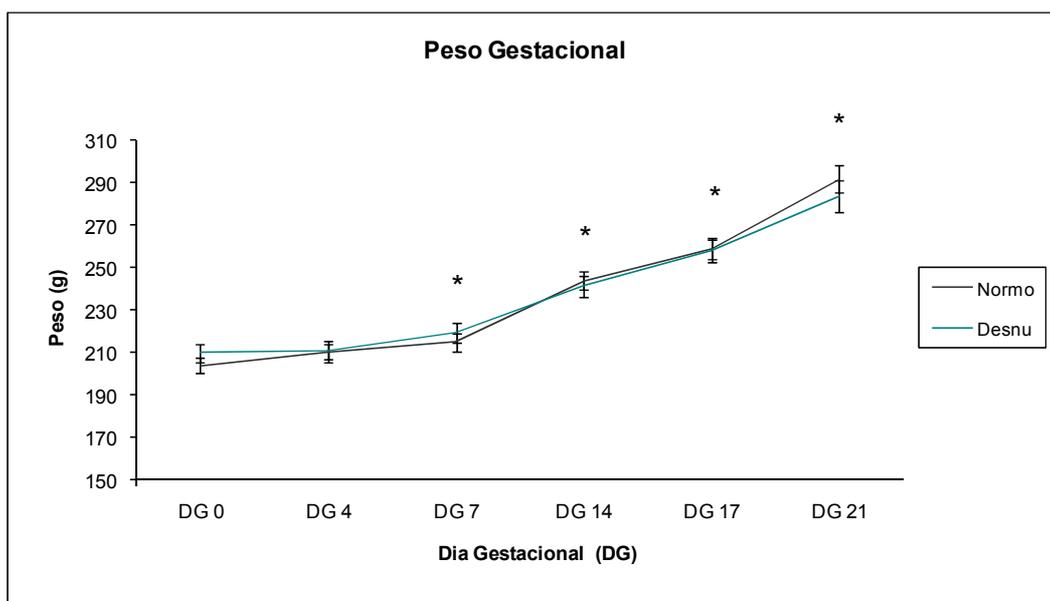


FIGURA 11 - Ganho de peso das ratas-mães no período gestacional. Os dados são expressos como média \pm EP. Os valores foram considerados significativos quando $p<0,05$. * Diferença entre os dias gestacionais.

Os dados referentes ao ganho de peso corporal das ninhadas no período compreendido entre o 1º dia pós-natal e o 7º são apresentados na FIGURA 12. Os resultados foram analisados por ANOVA seguida do teste de Duncan para

múltiplas comparações. Não houve diferença significativa entre os grupos em PND1. A análise evidenciou médias de peso significativamente menores no grupo desnutrido quanto ao fator dieta em PND4 ($F(1,16)= 20,55, p<0,01$) e PND7 (dia em que foram submetidos à hipóxia-isquemia) ($F(1,16)=80,26 p<0,01$).

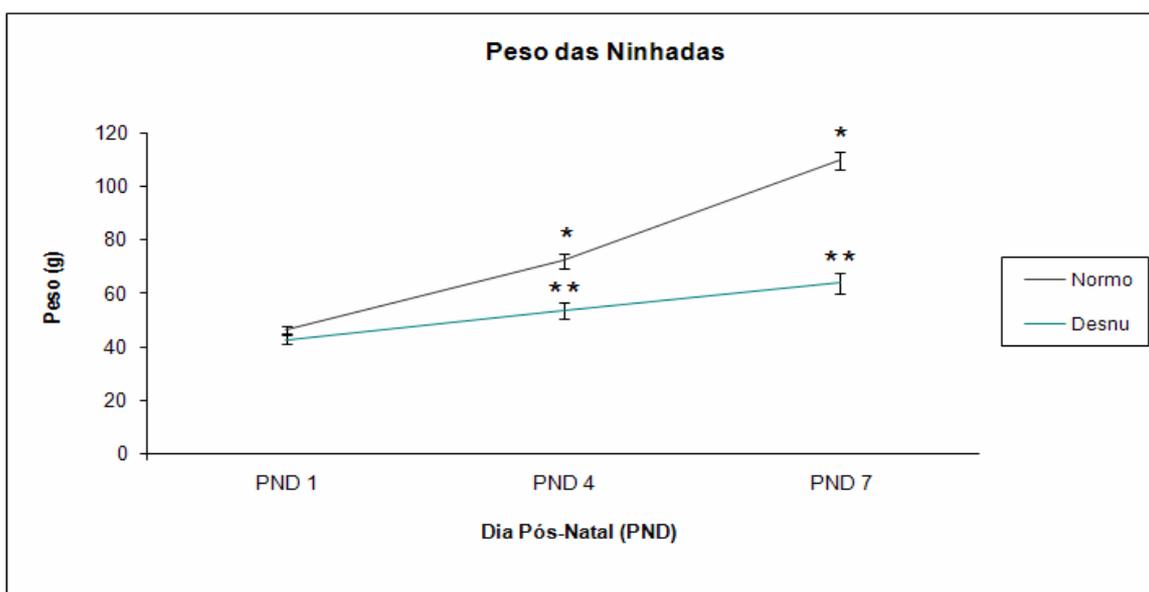


FIGURA 12 - Ganho de peso das ninhadas no período pós-natal (as ninhadas possuem entre 7 e 8 animais). Os dados são expressos como média \pm EP. Os valores foram considerados significativos quando $p<0,05$. * Diferença entre os dias gestacionais. ** Diferença entre os grupos normoalimentado e desnutrido.

Os dados referentes ao ganho de peso corporal dos animais no período compreendido entre o 11º dia pós-natal e 60º são apresentados na TABELA 2. Em PND11 a ANOVA revelou diferenças significativas quanto ao fator dieta ($F(1,61)=187,45, p<0,01$) e fator procedimento ($F(3,61)= 2,90 p=0,04$). Em PND21, houve diferença quanto ao fator dieta ($F(1,61)=197,50, p<0,01$) e fator procedimento ($F(3,61)= 2,70, p=0,05$). Em PND30 houve efeito do fator dieta

(F(1,61)= 1,46, p<0,01) assim como em PND60 (F(1,61)= 5,85 p=0,01). Não houve, em nenhum dos tempos, interação entre procedimento e dieta.

	PND11 (*) (§)	PND21 (*) (§)	PND30 (*)	PND60 (*)
SHAMNN	21,2 ± 0,9	37,7 ± 1,4	79,8 ± 3,9	226,7 ± 13,9
INN	21,6 ± 0,9	38,2 ± 1,4	77,2 ± 3,9	212,8 ± 13,9
HNN	20,8 ± 1,0	38,8 ± 1,6	82,7 ± 4,5	237,1 ± 15,7
HINN	18,3 ± 0,8	35,5 ± 1,3	70,3 ± 3,7	203,2 ± 13,2
SHAMDN	9,0 ± 1,1	18 ± 1,8	51 ± 4,8	184 ± 17,0
IDN	10,4 ± 1,0	21,7 ± 1,6	52,1 ± 4,5	175 ± 15,7
HDN	11,3 ± 1,6	24 ± 2,5	57 ± 6,8	215,3 ± 24,1
HIDN	8,8 ± 0,8	18,4 ± 1,3	50 ± 3,7	194,6 ± 13,2

TABELA 2 - Avaliação do ganho de massa corporal de ratos do PND11 à vida adulta (PND60). Os dados são expressos como média ± EP. Os valores foram considerados significativos quando p<0,05. * Efeito da dieta. § Efeito do procedimento.

4.2 Testes motores

Os dados apresentados nas tabelas 3, 4 e 5 referem-se ao desenvolvimento motor dos animais aos 7 dias de vida. Os reflexos já se mostram presentes no sétimo dia de vida, dia da realização da hipóxia-isquemia. Não foram constatados atrasos no desenvolvimento motor dos animais quando analisado o reflexo de endireitamento pré HI ($X^2=9,98$ $p=0,18$) e pós HI ($X^2=9,43$ $p=0,22$). Quanto aos reflexos de geotaxia negativa pré ($X^2=15,20$ $p=0,03$) e pós HI ($X^2=3,72$ $p=0,81$) e de preensão palmar pré ($X^2=18,44$ $p=0,01$) e pós HI ($X^2=1,14$ $p=0,99$) houve diferença significativa na avaliação pré-HI entre os grupos normo e desnutridos, não sendo observada diferença na avaliação após o procedimento de hipóxia-isquemia.

PND7 Pré-HI	Reflexo de Endireitamento								
Grupos	SHAMNN	INN	HNN	HINN	SHAMDN	IDN	HDN	HIDN	Total
Realiza o movimento (+)	10	10	7	10	11	7	6	12	75
Realiza o movimento (%)	13,16	13,16	9,21	13,16	14,47	9,21	7,89	15,79	98,68
Não realiza (-)	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Não realiza (%)	0	0	0	0	0	0	1,32	0	1,32
PND7 Pós-HI	Reflexo de Endireitamento								
Grupos	SHAMNN	INN	HNN	HINN	SHAMDN	IDN	HDN	HIDN	Total
Realiza o movimento (+)	10	10	7	10	11	7	6	12	73
Realiza o movimento (%)	13,16	13,16	9,21	13,16	14,47	9,21	7,89	15,79	96,05
Não realiza (-)	0	0	0	2	0	0	1	0	3
Não realiza (%)	0	0	0	2,62	0,00	0,00	1,32	0	3,94

TABELA 3 - Reflexo de endireitamento. Os valores indicam o número de animais e porcentagens na realização do teste. Foi dada a resposta (+) quando o animal realizava o movimento e assumia a posição de decúbito ventral e (-) quando não o realizava. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Foi utilizado o teste qui-quadrado.

PND7 Pré-HI (*)	Geotaxia negativa								
Grupos	SHAMN N	INN	HNN	HINN	SHAMDN	IDN	HDN	HIDN	Total
Realiza o movimento (+)	7	5	2	8	6	6	6	12	52
Realiza o movimento (%)	9,21	6,58	2,63	10,53	7,89	7,89	7,89	15,79	68,42
Não realiza (-)	3	5	5	4	5	1	1	0	24
Não realiza (%)	3,95	6,58	6,58	5,26	6,58	1,32	1,32	0,00	31,58
PND7 Pós-HI	Geotaxia Negativa								
Grupos	SHAMN N	INN	HNN	HINN	SHAMDN	IDN	HDN	HIDN	Total
Realiza o movimento (+)	8	8	3	9	8	5	5	9	55
Realiza o movimento (%)	10,53	10,53	3,95	11,84	10,53	6,58	6,58	11,84	72,37
Não realiza (-)	2	2	4	3	3	2	2	3	21
Não realiza (%)	2,63	2,63	5,26	3,95	3,95	2,63	2,63	3,95	27,63

TABELA 4 - Reflexo de geotaxia negativa. Os valores indicam o número de animais e porcentagem de animais que apresenta uma resposta (+) quando realiza o movimento de virar-se 180° quando colocado com a cabeça virada para baixo em uma superfície inclinada 30°. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Foi utilizado o teste qui-quadrado.

PND7 Pré-HI (*)	Preensão Palmar								
Grupos	SHAMN N	INN	HNN	HINN	SHAMDN	IDN	HDN	HIDN	Total
Realiza o movimento (+)	10	10	7	12	9	6	4	7	65
Realiza o movimento (%)	13,16	13,16	9,21	15,79	11,84	7,89	5,26	9,21	85,53
Não realiza (-)	0	0	0	0	2	1	3	5	11
Não realiza (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	2,63	1,32	3,95	6,58	14,47
PND7 Pós-HI	Preensão Palmar								
Grupos	SHAMN N	INN	HNN	HINN	SHAMDN	IDN	HDN	HIDN	Total
Realiza o movimento (+)	8	8	6	10	8	6	5	9	60
Realiza o movimento (%)	10,53	10,53	7,89	13,16	10,53	7,89	6,58	11,84	78,95
Não realiza (-)	2	2	1	2	3	1	2	3	16
Não realiza (%)	2,63	2,63	1,32	2,63	3,95	1,32	2,63	3,95	21,05

TABELA 5 - Reflexo de preensão palmar. Os valores indicam o número de animais e porcentagens na realização do teste. Uma resposta (+) indica que o animal realizou o movimento de preensão. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Foi utilizado o teste qui-quadrado.

4.3 Estado oxidativo celular

Os resultados referentes às alterações em marcadores bioquímicos estão apresentados nas TABELAS 6, 7, 8 e 9 e expressos como porcentagem do grupo SHAMNN \pm erro padrão. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações e não evidenciaram diferenças significativas em hipocampo, estriado e hipotálamo nas medidas de: formação de radicais livres, peroxidação de lipídeos, resíduos de triptofano e tióis totais. No cerebelo, houve redução significativa na formação de radicais livres, medido pelo teste de DCF nos animais alimentados com dieta hipoprotéica. Efeito do fator dieta ($F(1,61)= 5,05$ $p=0,02$).

	DCF	TBARs	Tióis	TRI
SHAMNN	99,5 \pm 9,1	100,0 \pm 12,7	99,9 \pm 13,8	99,6 \pm 9,2
INN	92,7 \pm 11,1	91,3 \pm 8,7	96,0 \pm 15,7	110,9 \pm 10,5
HNN	86,4 \pm 8,6	102,3 \pm 10,6	109,7 \pm 13,8	114,5 \pm 8,8
HINN	86,2 \pm 9,1	103,6 \pm 10,6	76,2 \pm 14,7	105,3 \pm 8,8
SHAMDN	87,0 \pm 10,3	95,0 \pm 11,9	102,9 \pm 18,6	99,6 \pm 9,2
IDN	85,2 \pm 9,1	102,5 \pm 11,9	94,1 \pm 15,7	94,4 \pm 9,2
HDN	83,9 \pm 11,1	97,8 \pm 12,7	66,2 \pm 29,4	98,1 \pm 10,5
HIDN	87,4 \pm 10,3	103,3 \pm 10,6	74,3 \pm 14,7	103,2 \pm 11,3

TABELA 6 - Medidas do estado oxidativo celular em estriado do hemisfério cerebral direito 4hs após a hipóxia-isquemia neonatal. Os dados são expressos como média da porcentagem do controle (SHAMNN) \pm EP em um n de 6 a 11 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais estudados.

	DCF	TBARs	TIÓIS	TRI
SHAMNN	99,9 ± 8,7	100,4 ± 9,2	99,0 ± 8,6	100,6 ± 7,5
INN	94,1 ± 9,2	123,5 ± 9,2	101,0 ± 9,1	111,4 ± 7,0
HNN	93,8 ± 8,2	104,2 ± 8,1	101,3 ± 8,1	114,7 ± 6,2
HINN	91,0 ± 10,6	102,0 ± 8,6	81,1 ± 8,1	106,2 ± 6,2
SHAMDN	99,7 ± 9,2	114,1 ± 9,2	81,8 ± 9,7	109,8 ± 7,5
IDN	96,6 ± 8,7	105,1 ± 8,1	84,6 ± 8,6	108,8 ± 6,6
HDN	99,3 ± 9,2	101,5 ± 8,6	91,2 ± 9,1	113,7 ± 7,0
HIDN	84,1 ± 10,6	110,9 ± 8,6	92,3 ± 8,6	118,2 ± 7,0

TABELA 7 - Medidas do estado oxidativo celular em hipocampo do hemisfério cerebral direito 4hs após a hipóxia-isquemia neonatal. Os dados são expressos como média da porcentagem do controle (SHAMNN) ± EP em um n de 6 a 11 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais estudados.

	DCF (*)	TBARs	TIÓIS	TRI
SHAMNN	99,9 ± 6,0	99,5 ± 10,9	99,9 ± 8,6	100 ± 7,1
INN	91,8 ± 7,0	108,8 ± 10,3	122,2 ± 10,1	115,9 ± 7,9
HNN	89,4 ± 6,3	108,0 ± 9,8	112,6 ± 9,1	111,8 ± 7,5
HINN	92,9 ± 7,5	128,1 ± 10,9	112,2 ± 9,5	108,2 ± 7,9
SHAMDN	85,2 ± 7,5	113,8 ± 10,9	88,3 ± 11,7	112,2 ± 8,4
IDN	85,1 ± 8,1	107,2 ± 10,9	98,6 ± 9,5	109,9 ± 7,9
HDN	85,0 ± 8,1	101,2 ± 211,7	115,1 ± 10,8	121,9 ± 9,0
HIDN	71,8 ± 8,1	122,3 ± 12,6	106,3 ± 11,7	103,09 ± 8,4

TABELA 8 - Medidas do estado oxidativo celular em cerebelo 4hs após a hipóxia-isquemia neonatal. Os dados são expressos como média da porcentagem do controle (SHAMNN) ± EP em um n de 6 a 11 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. * Efeito da dieta.

	DCF	TBARs	TIÓIS	TRI
SHAMNN	99,7 ± 15,6	100,9 ± 13,0	100,0 ± 12,8	99,9 ± 6,8
INN	110,5 ± 12,3	126,7 ± 13,8	119,0 ± 13,7	108,4 ± 7,5
HNN	120,2 ± 12,3	109,0 ± 13,0	103,7 ± 13,7	119,5 ± 7,5
HINN	94,4 ± 12,3	116,6 ± 13,8	110,5 ± 12,8	104,7 ± 7,1
SHAMDN	104,7 ± 14,3	109,3 ± 15,9	103,5 ± 14,8	95,1 ± 9,2
IDN	104,1 ± 12,3	100,8 ± 13,0	132,0 ± 13,7	105,4 ± 7,5
HDN	97,5 ± 13,2	115,2 ± 14,8	86,5 ± 16,2	104,1 ± 8,0
HIDN	109,4 ± 11,6	119,1 ± 13,8	95,2 ± 13,7	103,5 ± 7,5

TABELA 9 - Medidas do estado oxidativo celular em hipotálamo 4hs após a hipóxia-isquemia neonatal. Os dados são expressos como média da porcentagem do controle (SHAMNN) ± EP em um n de 6 a 11 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais estudados.

4.4 Comportamento olfatório

A performance dos animais no teste de discriminação olfatória mostrou-se inalterada nos animais submetidos previamente à hipóxia-isquemia. Quando testados novamente após o procedimento, a ANOVA revelou diferenças significativas quanto ao fator dieta ($F(1,114)=64,30$, $p<0,01$), ao fator hipóxia-isquemia ($F(3,114)=9,40$, $p<0,01$) e na interação entre os dois fatores ($F(3,114)=2,55$, $p=0,05$) evidenciando menor capacidade de reconhecimento do odor do ninho nos animais submetidos à HI, sendo mais pronunciada a dificuldade nos animais do grupo HIDN.

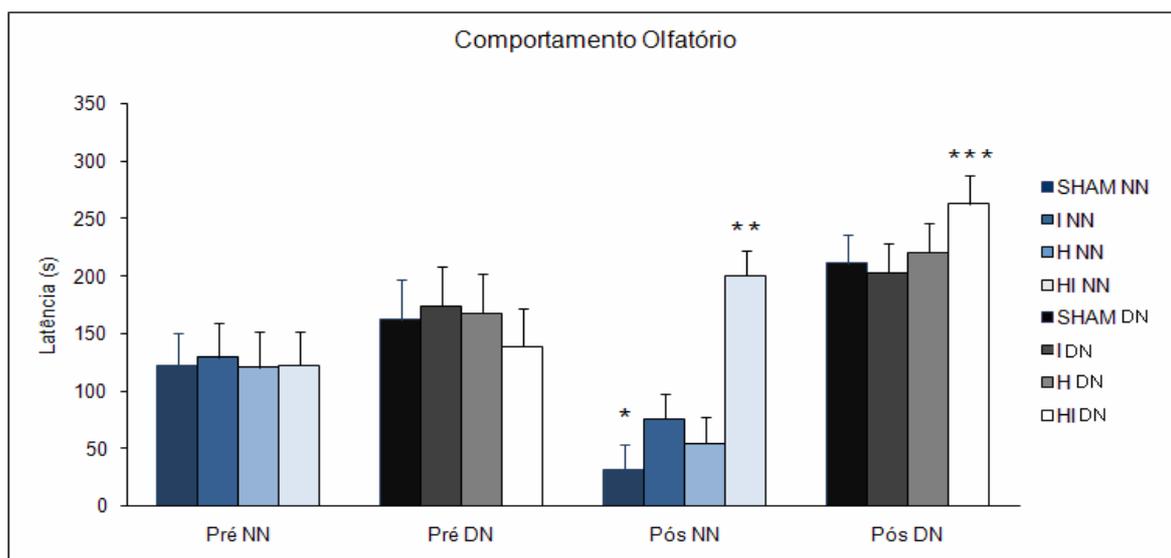


FIGURA 13 - Comportamento olfatório dos animais aos 7 dias. Os valores Pré são relativos à avaliação prévia à cirurgia. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os dados são expressos como média \pm EP. Os valores foram considerados significativos quando $p<0,05$. * SHAMNN pré e pós-HI. ** HINN em relação aos outros grupos NN pós-HI. *** HIDN pré e pós-HI.

4.5 Campo aberto

No teste de campo aberto foram verificados o somatório do número de cruzamentos nos primeiros 2 minutos e 2 últimos de teste, assim como o número de respostas verticais de orientação nos mesmos tempos. Com relação ao número de cruzamentos, não houve diferença entre os grupos experimentais nos dois intervalos de tempo. Com relação ao número de respostas verticais de orientação, nos 2 últimos minutos do teste, a ANOVA revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais com relação ao fator procedimento ($F(3,63)= 3,82, p=0,01$). Também foi verificada a latência para deixar o quadrante central do teste, e esta medida apresentou-se significativamente alterada, havendo interação da dieta e do procedimento ($F(3,63)=2,92 p=0,04$). Ver FIGURAS 14 - 18.

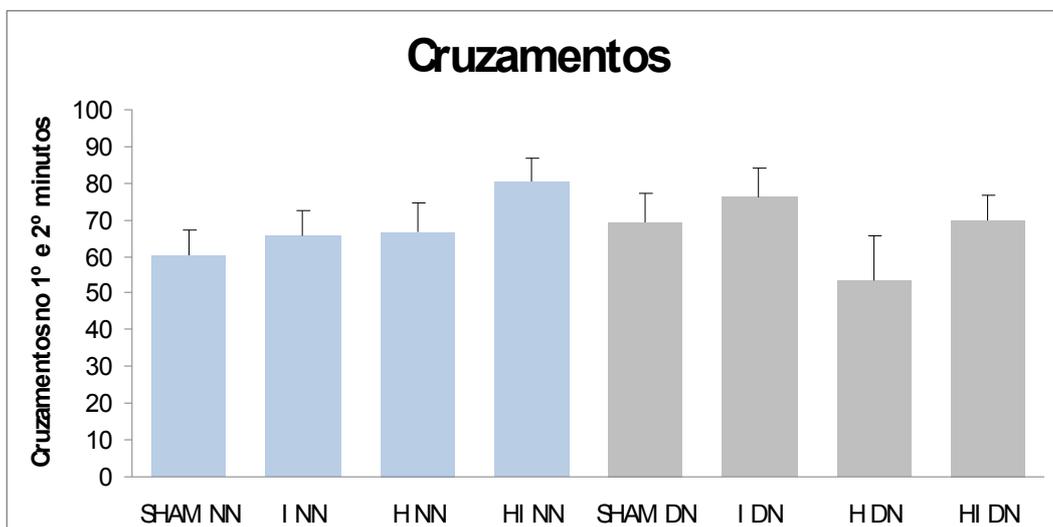


FIGURA 14 - Número de cruzamentos realizados no 1º e 2º minutos na tarefa de campo aberto. Os dados são expressos como média \pm EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

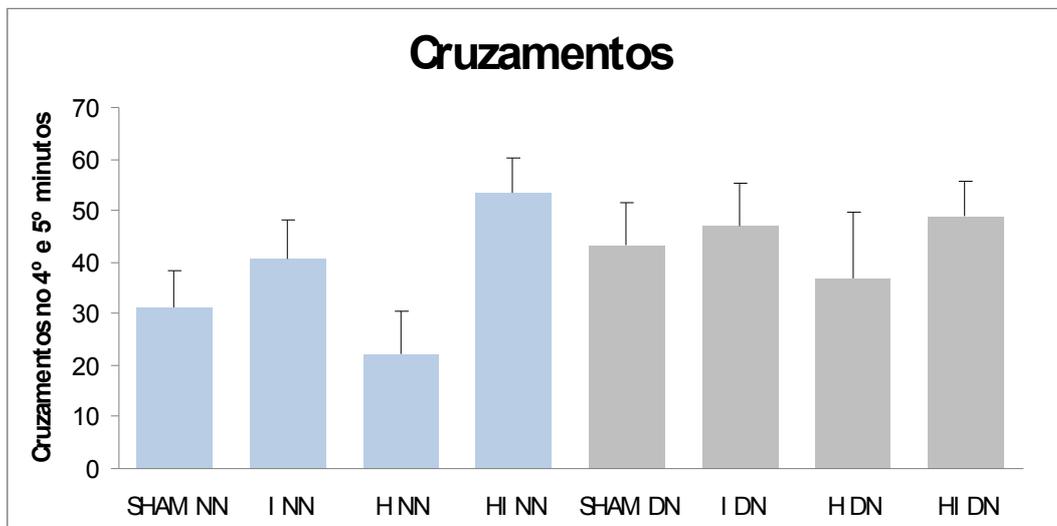


FIGURA 15 - Número de cruzamentos realizados no 4º e 5º minutos na tarefa de campo aberto. Os dados são expressos como média ± EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

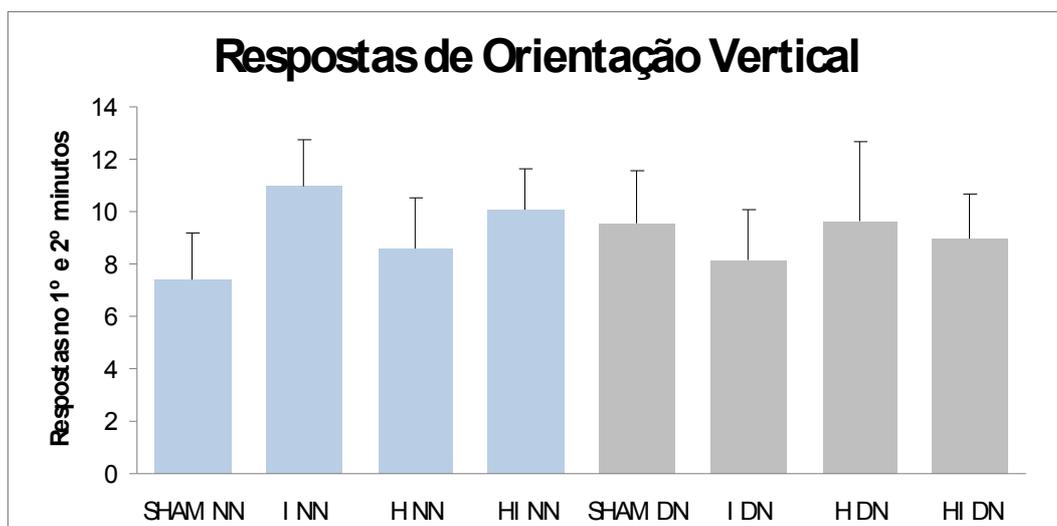


FIGURA 16 - Número de respostas de orientação vertical realizadas no 1º e 2º minutos na tarefa de campo aberto. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os dados são expressos como média ± EP. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

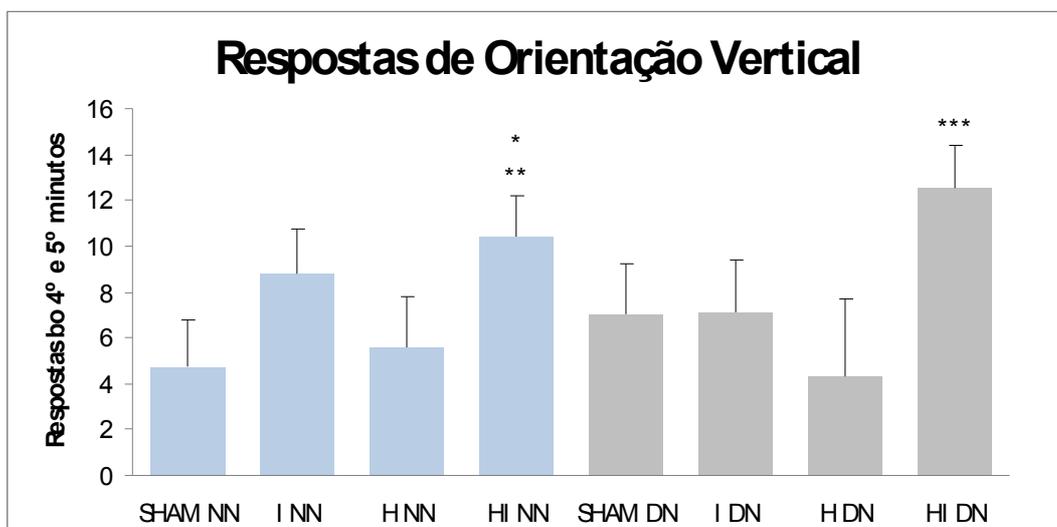


FIGURA 17 - Número de respostas de orientação vertical realizadas no 4º e 5º minutos na tarefa de campo aberto. Os dados são expressos como média \pm EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. * Diferença entre os grupos HINN e SHAMNN. ** Diferença entre os grupos HINN e HIDN. *** Diferença entre os grupos SHAMDN e HIDN.

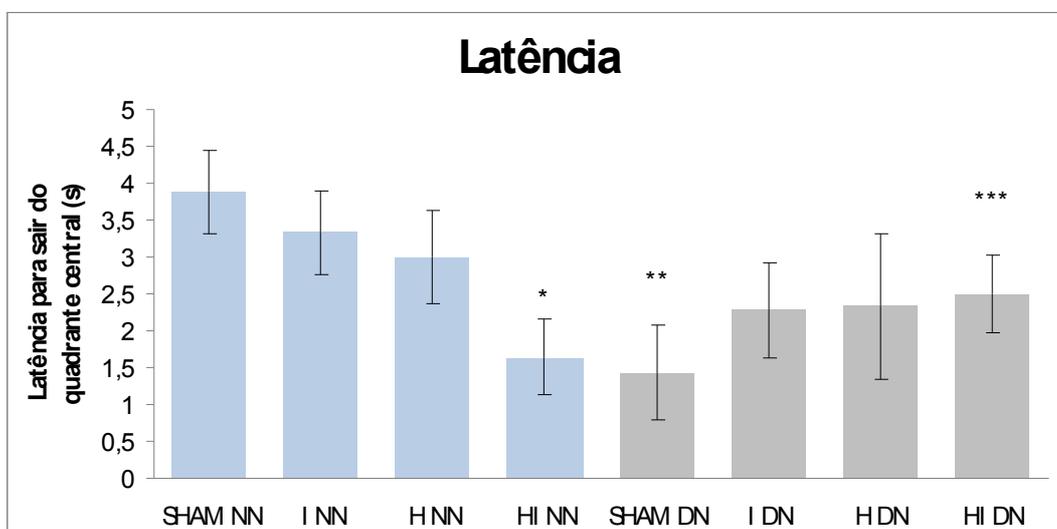


FIGURA 18 - Latência para deixar o círculo central do campo aberto. Os dados são expressos como média \pm EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. * Diferença entre o grupo HINN e SHAMNN. ** Diferença entre os grupos SHAMNN e SHAMDN. *** Diferença entre os grupos HINN e HIDN.

4.6 Rota-rod

Não houve diferença significativa no teste de *Rota-rod* tanto no treino quanto no teste. O teste foi avaliado por ANOVA seguido do teste de Duncan para múltiplas comparações. Os animais aparentemente demonstram similar capacidade de locomoção, equilíbrio e força.

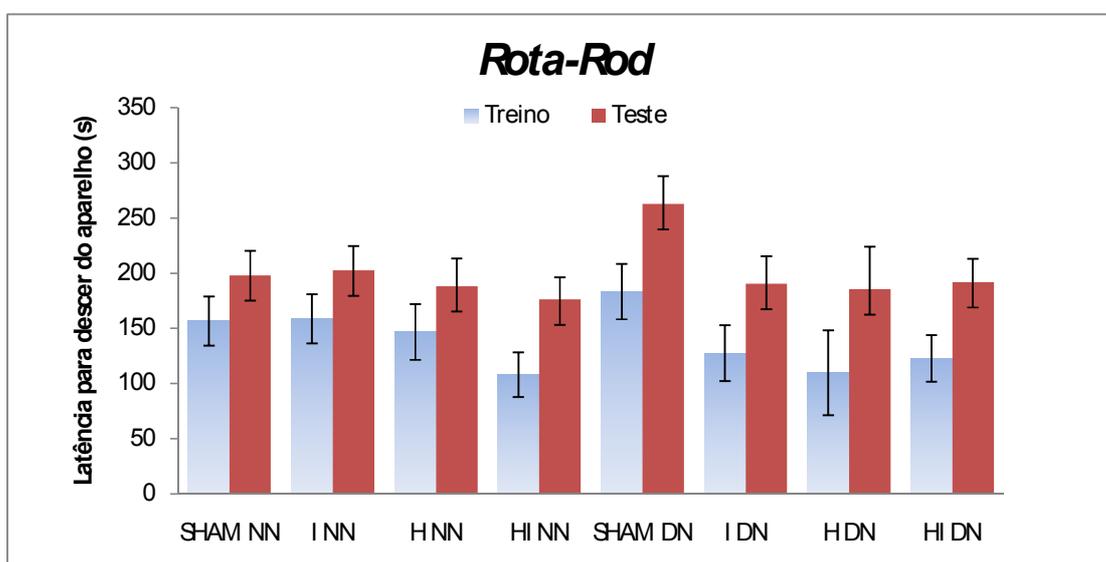


FIGURA 19 - Tempo de permanência em movimento sobre o cilindro no teste de *Rota-Rod*. Os dados são expressos como média \pm EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4.7 Esquiva inibitória

O teste de esquiva inibitória foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney para múltiplas comparações. Não foi verificado efeito significativo no treino nos grupos experimentais ($H=6,17$, $p=0,52$). No teste, houve diferença significativa ($H=15,47$, $p=0,03$) entre os animais. O teste de Mann-Whitney mostrou a diferença entre os grupos SHAMNN e HINN ($H=24,5$, $p=0,05$), SHAMDN e HINN ($H=10,50$, $p=0,01$) e HINN e HIDN ($H=20,00$, $p=0,01$), evidenciando uma possível reversão no déficit de memória causado pela HI.

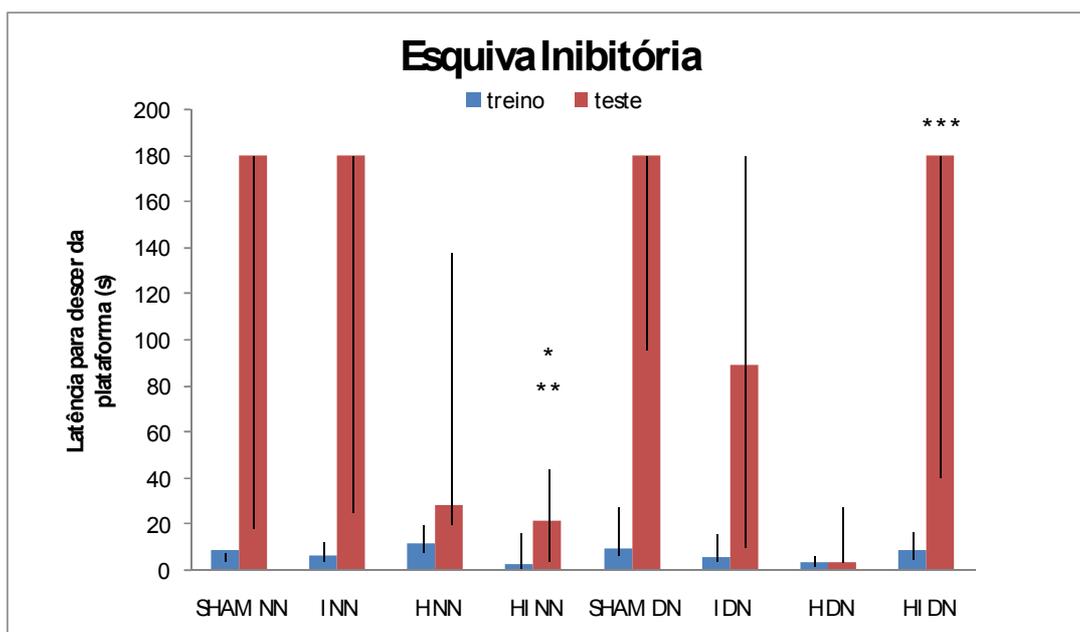


FIGURA 20 - Latência para descer da plataforma no teste da esquiva inibitória. Os resultados estão expressos em mediana e percentis 25% e 75%. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. * Diferença entre os grupos SHAMNN e os grupos HNN e HINN. ** Diferença entre os grupos SHAMDN e o grupo HINN. *** Diferença entre os grupos HINN e HI DN.

4.8 Peso encefálico

Os dados referentes ao peso encefálico aos 60 dias foram analisados por ANOVA seguido do teste de Duncan. Os resultados obtidos mostram efeito significativo do procedimento ($F(3,61)=7,14$, $p<0,01$) e do fator dieta ($F(1,61)=5,62$, $p=0,02$) sobre o peso encefálico total dos animais. No hemisfério ipsilateral à lesão houve efeito do fator procedimento ($F(3,61)=17,94$, $p<0,01$) e da interação entre dieta e procedimento ($F(3,61)=3,58$, $p=0,02$). Efeito do fator dieta no hemisfério esquerdo ($F(3,61)=6,93$, $p=0,01$). Ver FIGURAS 21 - 23.

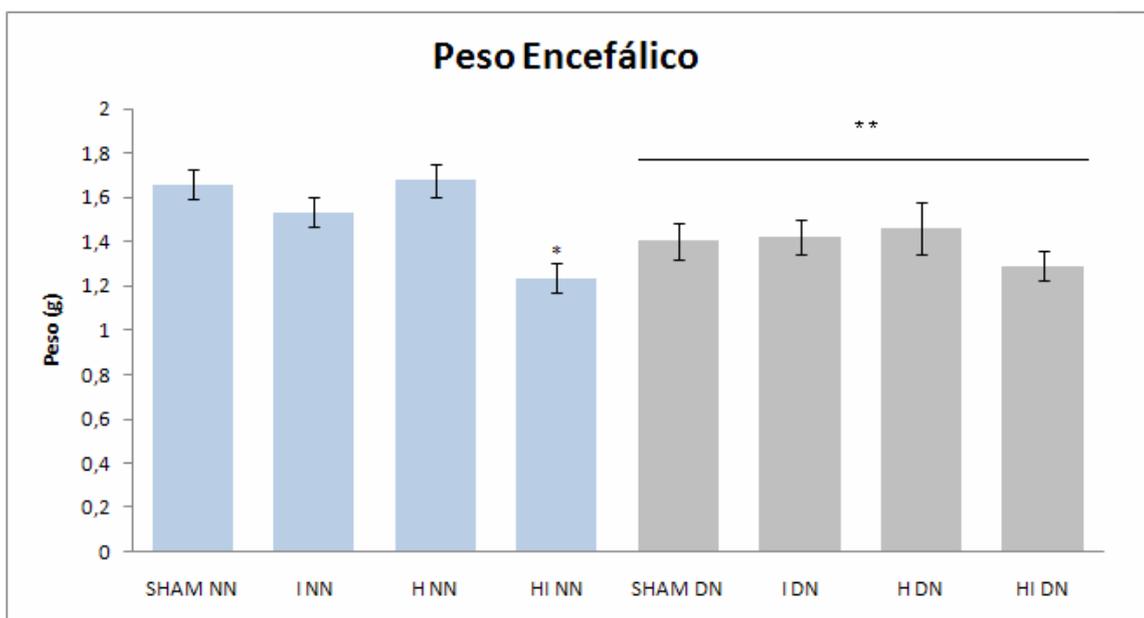


FIGURA 21 - Peso encefálico total dos animais aos 60 dias. Os dados são expressos como média \pm EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p<0,05$. * Diferença entre o grupo HINN e SHAMNN. ** Efeito do fator dieta.

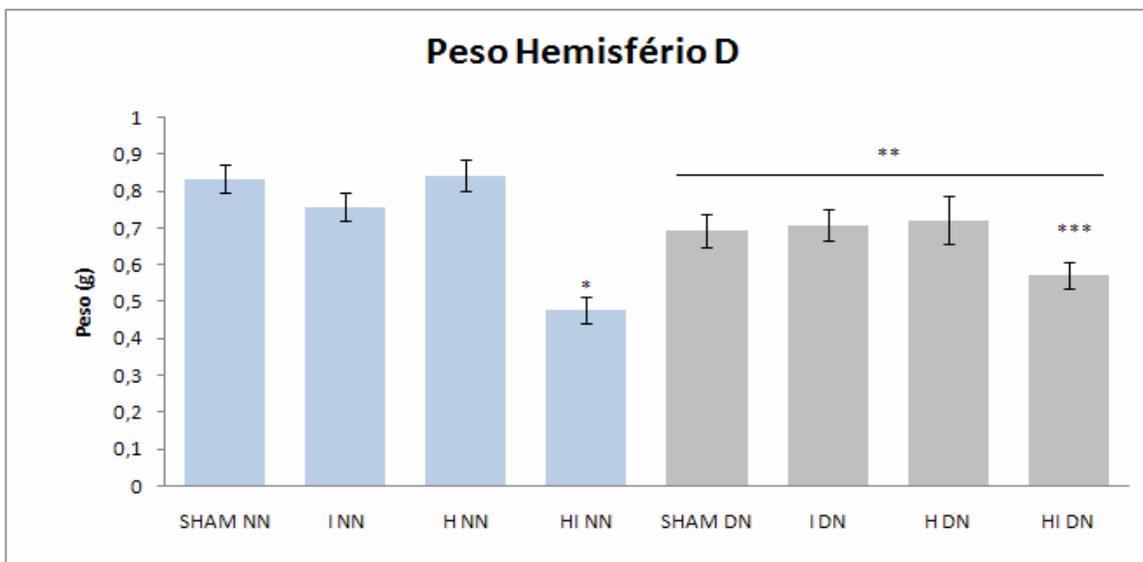


FIGURA 22 - Peso do hemisfério cerebral direito dos animais aos 60 dias. Os dados são expressos como média \pm EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. * Diferença entre o grupo HINN e SHAMNN. ** Efeito do fator dieta entre todos os grupos experimentais. *** Diferença entre o grupo HI DN e HINN.

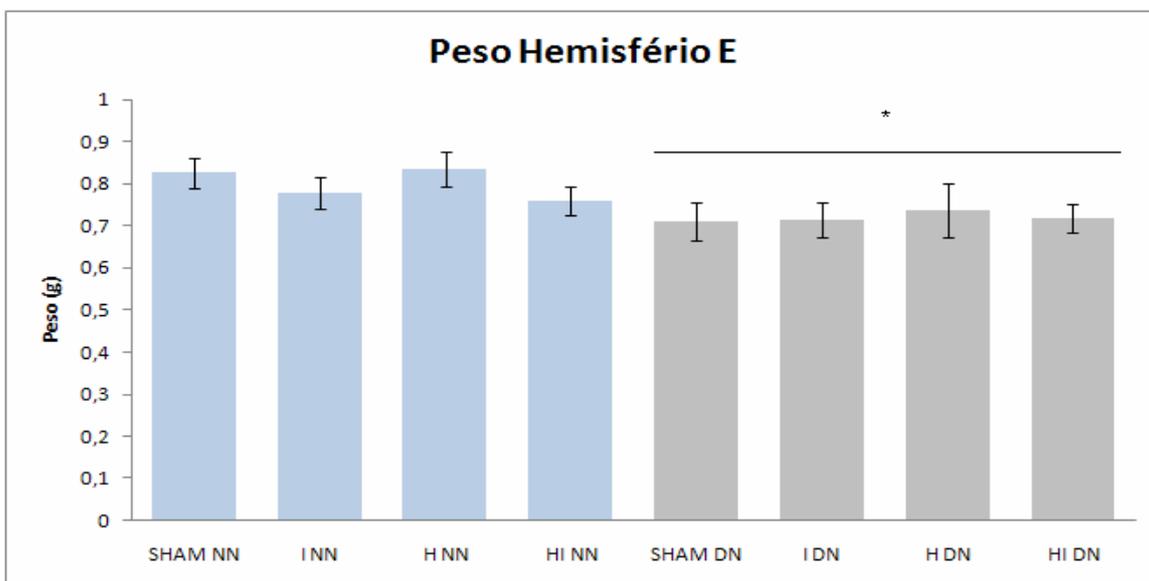


FIGURA 23 - Peso do hemisfério cerebral esquerdo dos animais aos 60 dias. Os dados são expressos como média \pm EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. * Efeito do fator dieta.

4.9 Dano cerebral

Os dados referentes ao dano encefálico foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do teste de Duncan. Houve efeito significativo do fator procedimento ($F(3,60)=39,63$, $p<0,01$) e a interação entre dieta e procedimento ($F(3,60)= 4,58$, $p<0,01$), mostrando um grau de dano menor nos animais desnutridos submetidos à HI e evidenciando um perfil neuroprotetor causado pela desnutrição.

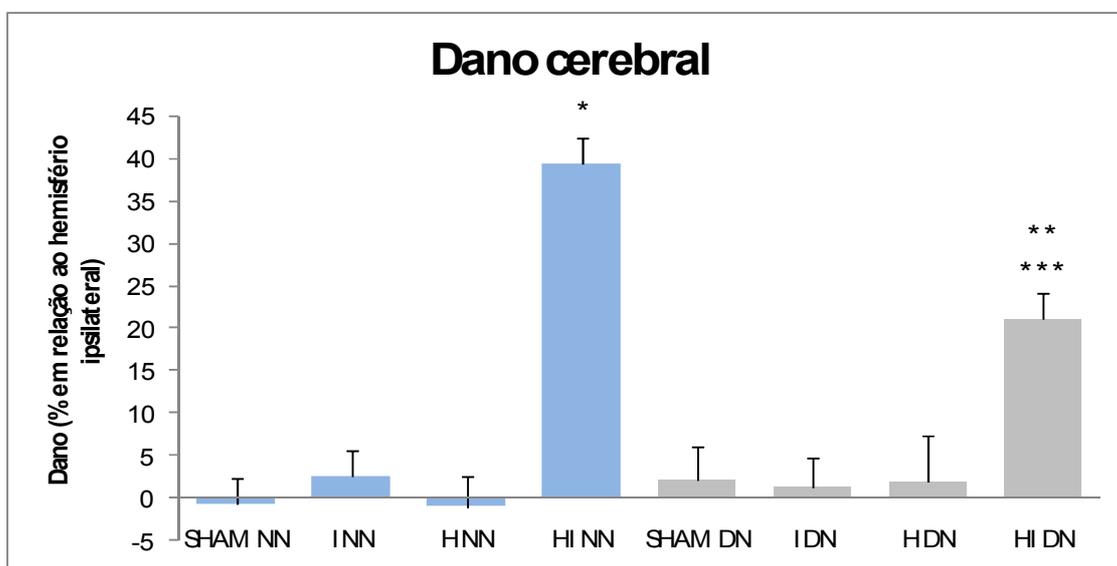


FIGURA 24 - Efeito da desnutrição sobre o dano encefálico causado pela hipóxia-isquemia neonatal. Os dados são expressos como % dano com relação ao hemisfério contralateral, tendo sido calculados pela fórmula $(\text{peso HE} - \text{peso HD}) / \text{peso HE} \times 100$. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os valores foram considerados significativos quando $p<0,05$. * Diferença entre o grupo HINN e demais grupos normonutridos. ** Diferença entre os grupos HI DN e SHAM DN. *** Diferença entre os grupos HINN e HI DN.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo descrever efeitos da desnutrição protéica, imposta nos períodos gestacional e lactacional em ratos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal, sobre parâmetros bioquímicos, comportamentais e histológicos, a curto e longo prazo.

As funções das proteínas estão ligadas a um grande número (quase que a totalidade) de reações homeostáticas, atuando como enzimas, anticorpos, hormônios, no equilíbrio ácido-básico, na distribuição de líquidos no organismo, no transporte de substâncias, de oxigênio, na coagulação sangüínea, atividade muscular e ainda como substrato energético (HARRIS, 1997).

A carência protéica na dieta pode acarretar problemas de saúde que se expressam pela perda de peso, baixa estatura, baixa resistência às infecções, podendo levar até mesmo ao óbito. Doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes mellitus, hipertensão, aterosclerose e doenças cardiovasculares parecem ter origem em alterações ocorridas no útero e durante o início da vida pós-natal (JOSHI *et al.*, 2003).

O baixo peso corporal em ratos submetidos à desnutrição protéica é um fenômeno amplamente relatado na literatura. O modelo de carência nutricional utilizado neste trabalho levou em conta a possibilidade de estabelecimento de comparativos com a literatura (SCHWEIGERT *et al.*, 2005; DE SOUZA *et al.*, 2004; ROTTA *et al.*, 2003; MORGANE *et al.*, 2002 e 1993; TONKISS *et al.*, 2000 e 1998; GRESSENS *et al.*, 1997).

Os resultados do ganho de peso corporal indicam que a alimentação com dieta de 7% de proteína foi eficiente em causar em filhotes uma desnutrição similar à do tipo Kwarshiorkor, exceto pela presença de edema (TORUN & CHEW, 1994; OKITOLONDA *et al.*, 1987).

Os animais desnutridos, a partir do momento em que foram alimentados com dieta padrão do biotério (PND21), obtiveram aumento de peso, porém, sempre se mantiveram com peso inferior aos animais dos grupos normonutridos (TABELA 2).

Para a diferença de peso durante a fase de lactação (FIGURA 12 e TABELA 2), deve-se levar em conta a deficiência em proteína no leite materno (restrita a 7% da dieta), o que pode ocasionar prejuízo no crescimento físico do animal (FUKUDA, *et al.*, 2002; ROCINHOLI *et al.*, 1997). As diferenças ponderais observadas no período lactacional entre os ratos mantidos com dieta hipoprotéica e os mantidos com dieta normoprotéica provavelmente foram desencadeadas pela desigualdade no teor protéico da dieta, uma vez que as duas dietas possuíam o mesmo conteúdo energético.

A deficiência no crescimento físico ocasionada pela desnutrição protéica foi verificada em nosso estudo, tendo em vista que o modelo utilizado neste trabalho causou uma marcada redução no ganho de massa corporal nos ratos pertencentes aos grupos desnutridos a partir do 4º dia de vida, permanecendo até os 60 dias (quando foram sacrificados) (TABELA 2).

Por suas particularidades anatômicas e funcionais, além de sua elevada susceptibilidade a lesões, o tecido cerebral parece ser particularmente vulnerável a insultos, em especial durante o período de desenvolvimento (ROUGEMONT *et*

al., 2002). As conseqüências de uma limitação anormal de nutrientes durante um período específico do desenvolvimento cerebral podem permanecer subliminarmente, ou apenas representar uma predisposição, até que o sistema seja exposto a circunstâncias emocionais ou ambientais não usuais (MORGANE *et al.*, 2002).

O desenvolvimento pós-natal é representado, dentre outros aspectos, pela maturação de reflexos neurológicos e coordenação motora (LUBICS *et al.*, 2005). Segundo o mesmo autor, a maior parte dos reflexos neurológicos parece surgir no rato a partir do 7º dia pós-natal. No presente estudo, os dados referentes ao surgimento dos reflexos motores foram semelhantes entre os grupos, onde pudemos verificar a presença de todos os reflexos já no PND7 previamente ao procedimento cirúrgico na maior parte dos animais. Especificamente quanto ao reflexo de endireitamento (TABELA 3), foi verificada a presença do reflexo na quase totalidade dos animais já no período pré-cirúrgico, mantendo-se após a HI. Foram encontradas diferenças significativas no teste de geotaxia negativa entre os animais normo e desnutridos no período pré-HI, onde uma grande parte dos animais desnutridos não conseguiu realizar adequadamente o teste. No período pós HI, uma maior parcela dos animais passa a realizar a tarefa, deixando de existir significância estatística (TABELA 4). Uma possível explicação para o fato, é que segundo Kunko e colaboradores (1996), o reflexo de geotaxia negativa costuma ser verificado a partir de 8 dias de vida. O teste de preensão palmar (TABELA 5) apresenta um resultado similar ao do reflexo de endireitamento, apresentando diferença significativa previamente à hipóxia-isquemia e na avaliação pós a HI os animais apresentam similar execução dos movimentos.

Porém, os resultados do teste devem ser analisados com cuidado, pois, pelo fato deste reflexo ser primitivo, sua tendência é de desaparecimento no decorrer da vida do animal, o que se verifica em nosso trabalho, onde se nota uma maior parcela dos animais com resposta negativa ao teste (TABELA 5). Com base em nossos resultados, podemos inferir que, de forma geral, os animais não apresentaram déficits ou retardos no desenvolvimento neurológico nos animais submetidos à desnutrição.

Segundo Tonkiss e colaboradores (1996), outra medida sensível do desenvolvimento pós-natal de felinos e roedores é a capacidade de localizar a ninhada quando separados desta, sendo esse parâmetro alterado em diferentes modelos de desnutrição. No PND7, enquanto os animais ainda não haviam sido submetidos à HI, apresentaram o mesmo padrão de resposta ao teste, com tempo de latência para encontrar a maravalha com odor do ninho de forma similar nos grupos normo e desnutridos. Houve, nos animais do grupo SHAMNN após a HI uma diminuição da latência para encontrar os ninhos após a HI, caracterizando uma possível memória da tarefa a ser realizada, ou seja, reconhecer o odor do ninho, ao contrário dos animais SHAMDN, que aumentaram sua latência. Após a hipóxia-isquemia, observamos os animais pertencentes aos grupos desnutridos, de forma geral, com desempenho inferior aos normonutridos, em especial os animais HIDN, que parecem ter sido mais afetados pela hipóxia-isquemia (FIGURA 13). Este resultado pode evidenciar um prejuízo na recuperação após a hipóxia-isquemia, talvez ocasionada pelo fator nutricional ou de fato uma lesão ao sistema olfatório dos animais pela hipóxia-isquemia e acentuada pela desnutrição.

Os resultados comportamentais apresentados pelos animais em idade precoce demonstram a hipóxia-isquemia atuando de forma isolada e em adição à desnutrição no teste de comportamento olfatório, aparentemente tendo um efeito sinérgico. Nos testes realizados para verificação do desenvolvimento motor dos animais, não foram verificados atrasos aparentes em idade precoce. Quando analisados na idade adulta no teste de *Rota-rod*, os animais desnutridos apresentaram capacidade de locomover-se sobre o cilindro similar aos dos grupos normonutridos (FIGURA 19), não evidenciando, portanto, atrasos no desenvolvimento motor, nem capacidade reduzida de locomoção.

Embora o crescimento e a maturação cerebral não sejam fenômenos comportamentais, eles são estreitamente relacionados e integrados ao desenvolvimento comportamental. Nesse contexto, o fator nutricional adquire fundamental importância. Segundo RANADE e colaboradores (2008), diferentes carências nutricionais implicam em diferentes alterações à morfologia encefálica, o que por sua vez provoca diferenças nas respostas dos animais em testes comportamentais.

A desnutrição afeta diferentes estruturas cerebrais de formas e/ou intensidades variadas, sendo o hipocampo, estrutura também afetada pelo insulto hipóxico-isquêmico e que possui funções relacionadas à memória, gravemente afetada pela desnutrição (MORGANE *et al.*, 2002; LEVITSKY & STRUPP, 1995; BEDI, 1992; CINTRA *et al.*, 1990).

Os resultados obtidos na esquiiva inibitória (FIGURA 20) mostraram uma menor latência para descer da plataforma em animais hipóxico-isquêmicos tanto normo, quanto desnutridos (demonstrando um déficit de memória aversiva e

evidenciando a lesão acarretada pela HI), porém os animais desnutridos apresentaram melhores resultados do que os normonutridos. Este resultado nos permite correlacionar a desnutrição a uma possível ação neuroprotetora, favorecendo o animal em uma atividade na qual um estímulo aversivo é desencadeado.

Podemos ainda inferir que a desnutrição protéica provocou um aumento da impulsividade e/ou redução da ansiedade corroborando dados de Almeida e colaboradores (1992, 1993) que se utilizaram dos testes de esquiva inibitória e labirinto em cruz elevado. Houve, nos animais desnutridos, hipersensibilidade a estímulos aversivos e aumentada atividade exploratória no labirinto em cruz elevado, quando o teste não envolvia o estímulo aversivo.

O teste de campo aberto avalia principalmente a atividade locomotora e exploratória dos animais, podendo também ser empregado para avaliação da ansiedade. Em nosso estudo, com relação ao teste, houve uma maior latência para que os animais SHAMNN deixassem o círculo central, quando comparados aos animais SHAMDN, mostrando uma menor ansiedade, ou melhor adaptação à exposição a um ambiente novo. A reduzida latência para deixar o círculo central dos animais HINN evidencia um maior nível de ansiedade ou impulsividade nos animais normonutridos submetidos à HI quando comparados aos HIDN (FIGURA 18). Não foram encontradas neste teste diferenças significativas no número de cruzamentos quando somados os dois primeiros minutos do teste, assim como nos dois últimos demonstrando similar atividade exploratória nos grupos experimentais (FIGURAS 14 e 15). Não houve diferença quanto ao número de cruzamentos totais, nem a relação entre cruzamentos centrais e periféricos (índice

de ansiedade). Quanto ao número de respostas de orientação vertical (FIGURAS 16 e 17), observamos uma diferença estatisticamente significativa nos 2 últimos minutos do teste mostrando uma maior movimentação vertical nos grupos submetidos à hipóxia-isquemia com relação aos grupos SHAMNN e SHAMDM, indicando maior atividade exploratória no novo ambiente. Este efeito foi verificado também com relação aos grupos HINN e HIDN, onde os animais desnutridos apresentaram maior atividade nos dois últimos minutos do teste.

O cérebro saudável, maduro e adequadamente nutrido nos mamíferos oxida a glicose como principal fonte de energia para manter a função celular, sendo o suprimento cerebral normal de oxigênio e glicose mantido pelo fluxo sanguíneo nas carótidas e artérias vertebrais. Desta forma, a integridade do fluxo sanguíneo está diretamente relacionada ao metabolismo cerebral (PEREZ-POLO, 1996).

Em modelos animais, a desnutrição protéica em idades precoces provoca alterações no tecido nervoso como: diminuição nos teores de glicogênio e glicose cerebrais; aumento na utilização de corpos cetônicos; aumento de ácido glutâmico e glutamina (GARRIGA & CUSSÓ, 1992; COLOMBO *et al.*, 1992; JOHN *et al.*, 1991); alteração significativa e seletiva à sensibilidade a drogas, agindo sobre diversos sistemas de neurotransmissores (ALMEIDA *et al.*, 1996; BUTLER *et al.*, 1994); favorecendo o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas (DIOP *et al.*, 2003; HACKET e IYPE, 2001; HOEK *et al.*, 1998; SUSSER *et al.*, 1996; SUSSER e LIN, 1992) podendo levar a uma redução no número de sinapses e prejuízo à transmissão de informações (MORGAN & WINICK, 1981; DYSON & JONES, 1976).

Torna-se oportuno ressaltar que, dentre os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela encefalopatia hipóxico-isquêmica, destaca-se a excitotoxicidade glutamatérgica. Durante a isquemia, a despolarização induzida pela entrada de Ca^{++} estimula a liberação dos neurotransmissores das vesículas sinápticas. Ocorre a liberação excessiva de glutamato e de outros aminoácidos excitatórios, os quais são liberados para o espaço extracelular e contribuem para a injúria neuronal (DUGAN & CHOI, 1999). Ocorre uma superativação de receptores NMDA, AMPA, dentre outros pelo excesso de glutamato e subsequente dano neuronal (FAROOQUI & HORROCKS, 1994).

As células gliais, em particular os astrócitos, são responsáveis pelo suporte metabólico de neurônios, que envolve a captação de glutamato e destinação desse aminoácido para consumo energético e síntese de glutamina, substância que é restituída ao neurônio para novamente ser convertida a glutamato (MAGISTRETTI *et al.*, 1999). Este mecanismo de recaptação do glutamato requer gasto energético e em uma situação de falência energética tal mecanismo se encontra prejudicado.

Quando há a presença de desnutrição e uma patologia associada (como por exemplo, a hipóxia-isquemia) o equilíbrio do sistema é rompido e provoca alterações do metabolismo celular, lesão do DNA e dos transportadores de íons das membranas celulares, elevação de cálcio e ferro ionizados e peroxidação lipídica. Quando ocorre a isquemia, em segundos há depleção de oxigênio e interrupção da fosforilação oxidativa. A glicose anaeróbia é insuficiente para manter a produção de ATP, não sendo capaz de fornecer a energia necessária às funções cerebrais. Sem a entrada de sangue para suprir de glicose o tecido

cerebral, este mobiliza os poucos estoques de glicogênio e posteriormente os de fosfocreatina em poucos minutos. Como as demandas energéticas não são alcançadas, ocorre depleção de ATP em poucos minutos (FAROOQUI & HORROCKS, 1994).

As células cerebrais utilizam 20% do oxigênio consumido no organismo, porém representam somente 2% do peso corporal, indicando alta atividade oxidativa. O cérebro tem alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, mais suscetíveis à lipoperoxidação. Estudos mostram que a proteína da dieta é importante para os mecanismos antioxidantes e que a desnutrição protéica pode levar ao aumento do dano oxidativo ao diminuir defesas antioxidantes do organismo (WANG *et al.*, 2002).

Estudos sugerem a existência de interações entre oxidantes e as vias que levam à morte neuronal, onde não só os oxidantes, mas o estado redox como um todo modula os mecanismos de regulação neuronal.

O estado redox celular é definido como o balanço entre os oxidantes e antioxidantes intracelulares e é regulado dentro de uma faixa ótima para a sobrevivência celular. Sob condições de estresse oxidativo, os mecanismos antioxidantes não conseguem neutralizar o seu conteúdo de radicais livres, pois os antioxidantes endógenos (vitamina C, tocoferol, tióis protéicos e a glutatona, primeiramente) são consumidos pelos insultos oxidativos.

A peroxidação de ácidos graxos insaturados de fosfolípidios das membranas plasmáticas pode resultar em significativa perda da integridade da membrana, sendo este um dos efeitos mais marcantes do dano oxidativo (TAPPEL, 1973), e leva à geração de aldeídos e alcanos potencialmente nocivos,

que reagem com o ácido tiobarbitúrico. O teste de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico é pouco específico, porém é freqüentemente empregado para avaliar o grau de dano oxidativo por sua fácil execução e baixo custo (TAPPEL, 1973). Além disso, modificações oxidativas de aminoácidos têm efeitos significativos na função celular, uma vez que proteínas oxidadas perdem sua atividade biológica e tendem a ser muito mais sensíveis à proteólise (STADTMAN & OLIVER, 1991).

Autores, como Martin e colaboradores (2000), encontraram aumento na formação de radicais livres entre 3 e 6 horas após a hipóxia-isquemia. Dentro deste intervalo de tempo optamos pelo sacrifício dos animais 4 horas após a hipóxia a fim de avaliarmos os efeitos bioquímicos da associação entre as duas patologias. Contudo, em ratos de 7 dias, no intervalo de tempo de 4 horas após a HI, não foram encontradas alterações na formação de radicais livres, danos oxidativos em macromoléculas, lipídios e proteínas, observados, respectivamente, nos ensaios de DCF, TBARs e conteúdo de resíduos de triptofano (TRI), em nenhum dos grupos experimentais. Também as defesas antioxidantes endógenas, medidas pela verificação dos tióis totais não apresentaram alteração significativa (TABELAS 6, 7, 8 e 9).

Foi observada neste intervalo de tempo nos grupos desnutridos, uma tendência à redução nos níveis de formação radicais livres (conteúdo de DCF formado) no cerebelo (TABELA 8), que pode ser explicada pela redução da atividade da cadeia respiratória, observada por Olorunsogo 1989 e 1992, em animais desnutridos. A observação de que mesmo em situação de estresse os grupos não apresentam diferenças significativas quanto à formação de espécies reativas, peroxidação lipídica e danos a proteínas contribui para o

fortalecimento da idéia de que, em alguns parâmetros, dependendo do momento da avaliação, o tecido parece manter-se em equilíbrio. Nesse contexto, pode-se considerar que os animais desnutridos desenvolvem uma adaptação ao estresse oxidativo gerado pela dieta, possivelmente aumentando as defesas antioxidantes. As defesas antioxidantes, chamadas a restabelecer o equilíbrio permitem ao organismo tolerar o estresse oxidativo leve e moderado. Porém, é oportuno ressaltar que as defesas antioxidantes não conferem proteção completa contra os radicais livres produzidos pelo organismo.

Em nosso trabalho, utilizamos as medidas de peso encefálico total (FIGURA 21), bem como dos hemisférios separadamente (FIGURAS 22 e 23) como medida de perda de tecido cerebral. Este parâmetro, mesmo apresentado limitações no seu significado, é de obtenção relativamente fácil e pode ser utilizado como um indicador de perda tecidual. No caso da desnutrição, a redução do peso encefálico total, resulta provavelmente do menor número e/ou menor tamanho dos elementos celulares, bem como de alterações nos processos de maturação neuronal (MORGANE *et al.*, 1992).

Vários relatos mostram que a desnutrição precoce ocasiona anormalidades nos processos de diferenciação neuronal e sinaptogênese (GRESSENS *et al.*, 1997), além de retardo na migração das células granulares em córtex de ratos (DEL ANGEL-MEZA *et al.*, 2001).

Já Gressens e colaboradores (1997), ao induzirem restrição protéica durante as duas primeiras semanas de gestação, observaram que os ratos na vida adulta apresentavam quase completa normalização dos parâmetros de desenvolvimento cerebral (citoarquitetura, diferenciação neuronal e glial). A

normalização desses parâmetros reflete a importante plasticidade do cérebro em desenvolvimento e sua habilidade em adaptar-se ao estresse intenso precoce (GRESSENS *et al.*, 1997).

Deste trabalho podemos sugerir que o encéfalo dos animais desnutridos aparentemente se comporta de forma diferenciada perante o insulto hipóxico-isquêmico, provavelmente por seu aparente metabolismo reduzido, corroborando os dados de Schweigert e colaboradores (2005). Propostas terapêuticas que se baseiam no decréscimo no metabolismo energético como, por exemplo, a hipotermia, têm sido difundidas nos últimos anos. Ela acarreta uma diminuição da demanda de O₂ pelo encéfalo, redução na densidade de aminoácidos excitatórios, redução da produção de radicais livres de O₂, redução da infiltração leucocitária nas áreas isquêmicas, diminuição da ativação microglial e da despolarização isquêmica, levando à diminuição dos efeitos da hipóxia-isquemia (PRANDINI *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2004; RIMPILAINEN *et al.*, 2000).

Ao associarmos a desnutrição protéica e a encefalopatia hipóxico-isquêmica em um modelo animal, em um primeiro momento se pensou que elas viessem a assumir um caráter aditivo, onde a desnutrição potencializaria o dano sofrido pelos animais. Porém, houve uma relativa adaptação à adversidade metabólica nos animais submetidos à desnutrição. Isso se mostrou de forma mais clara no teste de esquiva inibitória (FIGURA 20), onde os animais obtiveram melhor desempenho na tarefa. Podemos ainda correlacionar este dado ao de dano ocasionado ao tecido encefálico pela hipóxia-isquemia (FIGURA 24), onde o grau de dano sofrido aos animais desnutridos foi inferior àqueles dos animais

normonutridos, parecendo haver, ao menos com relação a estes parâmetros específicos, um caráter protetor gerado pela desnutrição protéica.

Os dados acima apresentados ainda demonstram a dificuldade em se estabelecer comparações entre os modelos animais empregados e sua extrapolação para o homem.

Patologias como a desnutrição ocorrem geralmente em associação a outros elementos, como fatores genéticos e ambientais (como por exemplo, doenças infecciosas, parasitárias, traumas no parto) e de natureza sócio-econômica, devendo ainda ser considerados fatores como as interações sociais durante a infância. Ainda assim, torna-se muito importante o desenvolvimento e aperfeiçoamento de modelos experimentais que possam contribuir para melhor compreensão dos danos causados por patologias como a desnutrição e a hipóxia-isquemia e dos seus mecanismos fisiopatológicos.

6. CONCLUSÕES

1. A desnutrição gestacional e pós-natal diminuiu significativamente o peso corporal dos animais, a partir do 4º dia pós-natal. O menor ganho de peso foi verificado nos animais desnutridos submetidos à hipóxia-isquemia até o dia do desmame.
2. A interação entre a dieta e o procedimento deixou de existir aos 30 dias, evidenciando uma provável recuperação nutricional, a partir do momento em que todos os grupos foram mantidos com ração padrão do biotério.
3. Não foram verificados aumento na formação de radicais livres, lipoperoxidação e danos a proteínas nas estruturas analisadas, tanto nos grupos normonutridos quanto nos desnutridos no intervalo de tempo de 4 horas após o final da hipóxia.
4. Não há evidência de atraso no desenvolvimento neurológico dos animais, nem com relação à hipóxia-isquemia nem quanto à dieta nos testes neuromotores realizados na fase lactacional.
5. Quando realizado na idade adulta, o teste de *Rota-rod* não evidenciou diferenças motoras significativas entre os grupos. Os animais permaneceram o mesmo tempo caminhando sobre o cilindro, evidenciando similar capacidade de locomoção, força e equilíbrio.

6. Os ratos desnutridos, quando submetidos ao modelo animal de hipóxia-isquemia neonatal apresentaram um prejuízo significativo na memória de orientação olfatória aos 7 dias, evidenciando uma capacidade reduzida de encontrar suas ninhadas quando separados de seus ninhos.

7. Os animais do grupo hipóxico-isquêmico desnutrido apresentaram melhor desempenho na tarefa de esQUIVA inibitória quando comparados aos animais hipóxico-isquêmicos normonutridos aos 60 dias. Com base neste resultado pode-se inferir um caráter de proteção oferecido pela dieta hipoprotéica quando o animal é submetido a um evento como a hipóxia-isquemia neonatal.

8. O modelo animal de hipóxia-isquemia neonatal em ratos resultou em visível área de infarto no hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida, sendo mais evidente nos animais do grupo normonutrido, onde ocasionou um dano morfológico significativamente maior. Este fato também nos permite sugerir um papel neuroprotetor proporcionado pela dieta protéica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121–126, 1984.

AHMAD, O.B.; LOPEZ, A.D.; INOUE, M. The decline in child mortality: A reappraisal. **Bulletin of World Health Organization**, v. 78, n. 10, p.1175-1191, 2000.

ALMEIDA, C.A.N. & RICCO, R.G. Nutritional assessment with emphasis to anthropometry. <http://www.pediatrinsaopaulo.usp.br/upload/html/392.pdf>, 1998.

ALMEIDA, S.S.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, n. 20, p. 389-402, 1996.

ALMEIDA, S.S.; GARCIA, R.A.; DE OLIVEIRA, L.M. Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, n. 54(4), p. 749-52, 1993.

ALMEIDA S.S.; SOARES, E.G.; BICHUETTE, M.Z.; GRAEFF, F.G.; DE OLIVEIRA, L.M. Effects of early postnatal malnutrition and chlordiazepoxide on experimental aversive situations. **Physiology & Behavior**, n. 51(6), p. 1195-9, 1992.

ALSCHER, S. 2002. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

AMATO, M. & DONATI, F. Update on perinatal hypoxic insult: mechanism, diagnosis and interventions. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 4, p. 203–209, 2000.

ANDRADE, J.P.; CADETE-LEITE, A.; MADEIRA, M.D.; PAULA-BARBOSA, M.M. Long-term low protein diet reduces the number of hippocampal mossy fibre synapses. **Experimental Neurology**, n. 112, p. 119-124, 1991.

ANTONOV, A.N. Children born during the siege of Leningrad in 1942. **Journal of Pediatrics**, v. 30, p. 250-259, 1947.

ARAÚJO, A.S.; PACHECO, S.S.; OLIVEIRA, A.G.; IMAIZUMI, C.; ABREU, L.C. Hypothermy as a protective strategy in asphyxiated newborns after hypoxic-ischemic encephalopathy. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**, v.18(3), p. 346-358, 2008.

ARTENI, N.S.; LAVINSKY, D.; RODRIGUES, A.L.; FRISON, V.B.; NETTO, C.A. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. **Neurobiology of learning and memory**, n. 78, p. 465-469, 2002.

ARTENI, N.S.; SALGUEIRO, J.; TORRES, I.; ACHAVAL, M.; NETTO, C. A. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. **Brain Research**, v. 973, p. 171–178, 2003.

BADAWI, N.; KURINCZUK, J.J.; KEOGH, J.M.; ALESSANDRI, L.M.; O’SULLIVAN, F.; BURTON, P.R. Intrapartum risk factors for newborn encephalopathy: the western australian case-control study. **BMJ (Cinical Research edition)**, n. 317, p. 1554–1558, 1998.

BALINT, J.P. Physical findings in nutritional deficiencies. **Pediatric clinics of North America. Philadelphia**, v. 245(1), p. 245-260, 1998.

BEDI, K.S. Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. **Physiology & Behavior**, n. 51, p. 1001-7, 1992.

BERGER, R. & GARNIER, Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. **Brain Research**, v. 30(2) p. 107-134, 1999.

BIAGAS, K. Hypoxic-ischemic brain injury: advancements in the understanding of mechanisms and potential avenues for therapy. **Current Opinion in Pediatrics**, n. 11 (3), p. 223-228, 1999.

BLACK, R.E.; ALLEN, L.H.; BHUTTA, Z.A. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **Lancet**, n. 371, p. 340-357, 2008.

BONA, E.; HAGBERG, A.; LOBERG, E.M.; BAGENHOLM, R.; THORENSEN, M. Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome. *Pediatric research*, n. 43, p.738-745, 1998.

BONATTO, F.; POLYDORO, M.; ANDRADES, M.E.; DA FROTA J.R.; M.L.; DAL-PIZZOL, F.; ROTTA, L.N.; SOUZA, D.O.; PERRY, M.L.; MOREIRA, J.C. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. **Brain Research**, v.25 (1042), p. 17–22, 2005.

BONATTO, F.; POLYDORO, M.; ANDRADES, M.E.; CONTE DA FROTA JR.; M.L.; DAL-PIZZOL, F.; ROTTA, L.N.; SOUZA, D.O.; PERRY, M.L.; FONSECA

MOREIRA, J.C. Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. **Neuroscience Letters**, V.9, p. 281–284, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, n. 72, p. 248-54, 1976.

BRIONI, J.D. & ORSINGHER, O.A. Operant behavior and reactivity to the anticonflict effect of diazepam in perinatally undernourished rats. **Physiology & Behavior**, n. 44(2), p. 193-8, 1988.

BRONZINO, J.D.; AUSTIN-LAFRANCE, R.J.; CHESTER, J.S.; MORGANE, P.J. Effect of protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioral measures. **Brain Research**, v. 384, p. 348-54, 1986.

BRONZINO, J.D.; AUSTIN-LAFRANCE, J.R.; MORGANE, P.J. Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. **Brain Research**, v. 515, p. 45-50, 1990.

BROWN, J.L. & POLLITT, E. Malnutrition, poverty and intellectual development. **Scientific American**, v. 274, p. 02, 1996.

BROWN, P. I. & BRASEL, J. A. "Endocrine changes in the malnourished child". In: SUSKIND, R. M. & LEWINTER-SUSKIND, L. (eds.). *The malnourished child*. New York, **Nestlé Nutrition Workshop Series**, v. 19, Nestec Ltd., Vevey/Raven Press Ltd., 1990.

BUTLER, P.D.; SUSSER, E.S.; BROWN, A.S.; KAUFMANN, C.A.; GORMAN,

M.D. Prenatal nutritional deprivation as a risk factor in schizophrenia: preclinical evidence. **Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 227-35, 1994.

CAMPOS, A.L.; NASCIMENTO, C.F.L.; GRAZINI, J.; TASSIS, A.N.; VÍTOLO, M.R.; NÓBREGA, F.J. Aspectos nutricionais, psicológicos e sociais de mães de criança desnutridas. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 4, p. 214-218, 1995.

CAULFIELD, L.E.; ONIS, M.; BLOSSNER, M.; BLACK, R.E. Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria and measles. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 193-198, 2004.

CARRAZZA, F.R. & MARCONDES, E. **Nutrição clínica em pediatria. São Paulo: Savier, 1991.**

CASTRO, C.A.; TRACY, M.; RUDY, J.W. Early-life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory processes mediating performance in a conditional-spatial discrimination task. **Behavioral Brain Research**, n. 32, p. 255-264, 1989.

CHÁVEZ, A.; MARTÍNEZ, H.; GUARNEROS, N.; ALLEN, L.; PELTO, G. Nutrición y desarrollo psicomotor durante el primer semestre de vida. **Salud pública de México**. n. 40, p. 109 – 10, 1998.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. n. 25(3), p.235-60, 2001.

CINTRA, L.; DIAZ-CINTRA, S.; GALVAN, A.; KEMPNER, T.; MORGANE, P.J. Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. **Brain Research**, v. 532, p. 271-277, 1990.

COLOMBO, J.P.; CERVANTES, H.; KOKOROVIC, M.; PFISTER, U.; PERRITAZ, R. Effect of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in rats. **Annals of Nutritional Metabolism**, n.36, p. 23-33, 1992.

DAMMANN, D.; WALTHER, H.; ALLERS, B.; SCHODER, M.; DRESCHER, J.; LUTZ, D. Development of a regional cohort of very low birth weight children at six years: cognitive abilities are associated with neurological disability and social background. **Developmental Medicine in Children Neurology**, v. 38, p. 97-108, 1996.

DAUNCEY, M.J. & BICKNELL, R.J. Nutrition and neurodevelopment: mechanisms of developmental dysfunction and disease in later life. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, p. 231-253, 1999.

DE ONÍS, M.; MONTEIRO, C.; CLUGSTON, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: overview from the WHO Global Database on Child Growth. **Bulletin of World Health Organization**, Geneva, v.71, n.6, p.703-712, 1993.

DE ONÍS, M.; BLOSSNER, M.; BORGHİ, E.; FRONGILLO, E.A.; MORRIS, R. Estimates of global prevalence of childhood underweight in 1990 and 2015. **Journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 21, p. 2600-2606, 2004.

DE SOUZA, K.B.; FEOLI, A.M.; KRÜGER, A.H.; DE SOUZA, M.R.; PERRY, C.T.; ROTTA, L.N.; SOUZA, D.O.; PERRY, M.L. Effects of undernutrition on glycine metabolism in the cerebellum of rats. **Annals of Nutrition & Metabolism**, n. 48(4), p. 246-50, 2004.

DEL ANGEL-MEZA, A.R.; RAMIREZ-CORTES, L.; OLIVERA-CORTES, E.; PEREZ-VEGA, M.I.; GONZALEZBURGOS, I. A tryptophan-deficient corn-based diet induces plastic responses in cerebellar cortex cells of rat offspring. **Journal of Developmental Neuroscience**, n. 19, p. 447-453, 2001.

DIAZ DEL CASTILLO, E. Considerações sobre desnutricion materna y desnutricion in utero. **Ginecologia y Obstetricia**, v. 37, p. 103-18, 1975.

DIOP, A.G.; DE BOER, H.M.; MANDLHATE, C.; PRILIPKO, L.; MEINARDI, H. The global campaign against epilepsy in Afrika. **Acta Tropica** 87:149-159, 2003.

DOBBING, J. Early nutrition and later achievement. London, UK: Academic Press, 1987.

DOBBING, J. & HOPEWELL, J.W. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. **Archives of Disease in Childhood**, n. 46, p. 736–737, 1971.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: DAVIDSON, N.A.; DOBBING, J. (Eds). *Applied Neurochemistry*. Oxford Blackwell Scientific Publications, Ltd., p. 287-316, 1968.

DOUGLAS, J. Eating problems in young children. **Hospital medicine** (London, England: 1998), n. 63(3), p. 140-3, 2002.

DUGAN, L. & CHOI, D.W. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In **SIEGEL et al., Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects**. 5ª edição, Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers, p. 712-729, 1999.

DURAN, R.; ALADAĞ, N.; VATANSEVER, U.; SÜT, N.; ACUNAŞ, B. The impact of Neonatal Resuscitation Program courses on mortality and morbidity of newborn infants with perinatal asphyxia. **Brain Development**, n. 30(1), p. 43-6, 2007.

DYSON, S.E. & JONES, D.G. Some effects of undernutrition on synaptic development -- a quantitative ultrastructural study, n. 114(3), p. 365-78, 1976.

EHRENBRINK, G.; HAKENHAAR, F.S.; SALOMON, T.B.; PETRUCCI, A.P.; SANDRI, M.R.; BENFATO, M.S. Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 368-371, 2006.

ELIA, M.; STRATTON, R.J. How much Undernutrition is there in hospitals? **The British Journal of Nutrition**, n. 84(3), p. 257-259, 2000.

ELLMAN, G.L. Tissue sulphhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70-77, 1959.

ENGIDAWORK, E.; CHEN, Y.; DELL'ANNA, E.; GOINY, M.; ANDERSON, K. Effect of perinatal asphyxia on systemic and intracerebral PH and glycolysis metabolism in rat. **Experimental Neurology**, n. 145, p. 390-396, 1997.

EVANS, P.H. Free radicals in brain metabolism and pathology. **Brain Medicine Bulletin**, v. 49, p. 577– 587, 1993.

FAVERO, A.M.; WEIS, S.N.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide changes behavior in female pups. **Neurotoxicology and Teratology**. n. 28, p. 607–616, 2006.

FAROOQUI, A.A. & HORROCKS, L.A. Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long-term potentiation and neurodegeneration. *Journal of Neuroscience Research*, n. 38(1), p. 6-11, 1994.

FEOLI, A.M.; SIQUEIRA, I.R.; ALMEIDA, L.; TRAMONTINA, A.C.; VANZELLA, C.; SBARAINI, S.; SCHWEIGERT, I.D.; NETTO, C.A.; PERRY, M.L.; GONCALVES, C.A. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. **Nutrition**, v. 22, p. 160–165, 2006a.

FEOLI, A.M.; SIQUEIRA, I.; ALMEIDA, L.M.; TRAMONTINA, A.C.; BATTU, C.; WOFCHUK, S.T.; GOTTFRIED, C.; PERRY, M.L.; GONÇALVES, C.A. Brain Glutathione Content and Glutamate Uptake Are Reduced in Rats Exposed to Pre- and Postnatal Protein Malnutrition. **The Journal of Nutrition**, V. 136, N. 9, 2357-2361, 2006b.

FIACCO, T.A.; ROSENE, D.L; GALLER, J.R.; BLATT, G.J. Increased density of hippocampal kainate receptors but normal density of NMDA and AMPA receptors in a rat model of prenatal protein malnutrition. **Journal of Comparative Neurology**, v. 456, n. 4, p. 350-360, 2003.

FREITAS, R.A; SOUZA, L.B; PINTO, L.P. Morphological and morphometric analysis of the parotid glands of rats submitted to different levels of protein deficiency. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**. v. 8, p. 43-49, 1994.

FUKUDA, M.T.; FRANÇOLIN-SILVA, A.L.; ALMEIDA, S.S. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. **Behavioral Brain Research**, n. 133(2), p. 271-277, 2002.

GALDINO, R.S. Desnutrição protéico-calórica. In: DÂMASO, A. **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Rio de Janeiro: MEDSI, p.255-275, 2001.

GALLER, J.R.; TONKISS, J.; MALDONADO-IRIZARRY, C.S. Prenatal protein malnutrition and home orientation in the rat. **Physiology & Behavior**, n. 55(6), p. 993-6, 1994.

GALLER, J.R.; SHUMSKY, J.S.; MORGANE, P.J. Malnutrition and brain development. **Nutrition in Pediatrics**, v. 2, cap. 14, p. 01-55. 1995.

GARCIA-RUIZ, M.; DIAZ-CINTRA S.; CINTRA L.; CORKIDI G. Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. **Brain Research**, n. 22, p. 203–212, 1993.

GARCIA, Y.J.; RODRIGUEZ-MALAVAR, A.J.; PENALOZA, N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 15 (144), p. 127–135, 2005.

GARRIGA, J. & CUSSÓ, R. Effect of starvation on glycogen and glucose metabolism in different areas of the rat brain. **Brain Research**, n. 591(2), p. 277-82, 1992.

GOODLETT, C.R.; VALENTINO, M.R.; MORGANE, P.; RESNICK, O. Spatial cue utilization in chronically malnourished rats: task-specific learning deficits. *Developmental Psychobiology*, n.19, p. 1-25, 1986.

GRESSENS, P.; MUAKU, S.M.; BESSE, L.; NSEGBE, E.; GALLEGU, J.; DELPECH, B.; GAULTIER, C.; EVRARD P.; KETELSLEGERS, J.M.; MAITER, D. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. **Developmental Brain Research**, n.103, p. 21-35, 1997.

GROENINK, L.; VERDOUW, P.M., VAN OORSCHOT, R.; BEREND, O. Models of Anxiety: Ultrasonic Vocalizations of Isolated Rat Pups. **Current Protocols in Pharmacology**, n, 43(5), p. 181-5.18.14, 2008.

HACKETT, R. & IYPE, T. Malnutrition and childhood epilepsy in developing countries. **Seizure**. v. 10, 554-558, 2001.

HALES, C.N. & BARKER, D.J.P. Type 2 (non-insulin-dependent) *diabetes mellitus*: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**. n. 35, p. 595-601,1992.

HALLIWELL, B.H. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction? **Annals of Neurology**, v. 32, p. 10-15, 1992.

HARRIS, R.A. Carbohydrate Metabolism I: major metabolic Pathways and their control. In: Devlin, T.M Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 4^a ed USA: John Wiley & Sons, inc, p. 267-333, 1997.

HOEK, H.W.; BROWN, A.S.; SUSSER, E. The Dutch famine and schizophrenia spectrum disorders. **Social Psychiatry Psychiatric Epidemiology**, n. 33(8), p. 373-9, 1998.

HORWITZ, W. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 13^a edição. **Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA, 1980.**

HOSSAIN, M.A. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. **Epilepsy and Behavior**, v. 7, p. 204-213, 2005.

IKEDA, T.; MISHIMA, K.; YOSHIKAWA, T.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M.; XIA, Y.X.; IKENOUE, T. Selective and Long-term Impairment Following Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Insult in Rats. **Behavioural Brain Research**, n. 118, p. 17-25, 2001.

JANSEN, E.M. & LOW, W.C. Long-term effects of neonatal ischemic- hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 78, p. 189–194, 1996.

JENSEN, F.E. The role of glutamate receptor maturation in perinatal seizures and brain injury. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 20 (3-5), p. 339-347, 2002.

JOHN, J.; PATEL, M.; TELANG, S.D. Effects of maternal dietary protein content on cerebral ketone body-metabolizing enzymes in the progeny of rats. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 2, p. 604-608, 1991.

JOSHI, S.; GAROLE, V.; DAWARE, M.; GIRIGOSAVI, S.; RAO, S. Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in Wistar rats. **Metabolism**, n. 52, p. 13-18, 2003.

KHAJURIA, A.; JOHRN, R.K.; ZUTSHI, U. Piperine mediated alterations in lipid peroxidation and cellular thiol status of rat intestinal mucosa and epithelial cells. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, n. 6, p. 351-355, 1999.

KUNKO, P.M.; SMITH, J.A.; WALLACE, M.J.; MAHER, J.R.; SAADY, J.J.; ROBINSON, S.E. Perinatal methadone exposure produces physical dependence and altered behavioral development in the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, n. 277(3), p. 1344-51, 1996.

KURIBARA, H.; HIGUCHI, Y.; TADOKORO, S. Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, n. 27(1), p. 117-26, 1977.

LAI, M. & LEWIS, P.D. Effects of undernutrition on myelination in rat corpus callosum. **Journal of Comparative Neurology**, n. 193, p. 973-982, 1980.

LAI M.; LEWIS, P.D.; E PATEL, A.J. Effects of undernutrition on gliogenesis and glial maturation in rat corpus callosum. **Journal of Comparative Neurology**, n. 193, p. 965-972, 1980.

LAUCHT M.; ESSER G., SCHMIT M.H. Development outcome of infants born with biological and psychosocial risks. **Journal of Children Psychology and Psychiatry**, v. 38, p. 843-53, 1997.

LEWIS, P.D.; PATEL, A.J.; BALÁZS, R. Effects of Undernutrition on cell generation in the rat hippocampus. **Brain Research**, v. 168, p. 186-189, 1979.

LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. **The American Journal of Pathology**, v. 36, p. 1–17, 1960.

LEVITSKY, D.A & STRUPP, B. Malnutrition and Brain: Chan in Concepts, Chan in Concerns. *The Journal of Nutrition*, n. 125, p. 2212-2220S, 1995.

LI, J.; WANG, H.; STONER, G.D.; BRAY, T.M. Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein malnourished mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, V. 13, p. 625–633, 2002.

LIU, Z.; FAN, Y.; WON, S. NEUMANN, M.; HU, D.; ZHOU, L.; WEINSTEIN, P.; LIU, J. Chronic Treatment With Minocycline Preserves Adult New Neurons and Reduces Functional Impairment After Focal Cerebral Ischemia. **Stroke**, n. 38, p. 146-152, 2007.

LIVERPOOL, G.G.; GRANT, A.W.; PENA, E.I. Malnutricion materna. Labor de enfermeria. **Revista Cubana de Enfermeria**, v. 6: p. 69-87, 1990.

LOW, A.J.; VENDE, J.; STEINBUSCH; BLANCO C.E. Apoptosis in the rat spinal cord during postnatal development; the effect of perinatal asphyxia on programmed cell death. **Neuroscience**, v. 112 (4), p.751-758, 2002.

LUBICS, A.; REGLODI, D.; TAMAS, A.; KISS, P.; SZALAI, M.; SZALONTAY L. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behavioral Brain Research**, n.157, p.157-165, 2005.

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**, n. 112, p. 85 – 97, 2000.

LYNCH, A. Passive avoidance behavior and response thresholds in adult male rats after early postnatal undernutrition. **Physiology and Behavior**, v. 16, p.27-32, 1976.

MADI, K. & CAMPOS, S.D. Experimental malnutrition: biochemical and anatomic-pathological results of feeding a protein-deficient diet to young albino rats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. n. 73, p.153-81, 1975.

MADRUGA, M.S.; SANTOS, H.B.; BION, F.M. Avaliação nutricional de uma dieta suplementada com multimistura: estudo em ratos. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, n. 24(1), p.129-33, 2004.

MAGISTRETTI, P.J.; PELLERIN L.; RTHMAN, D.L.; SHULMAN, R.G. Energy on demand. **Science**. n. 283, p. 486-487, 1999.

MANDARIN-DE-LACERDA, C.A. Métodos quantitativos em morfologia. **Eduerj, Rio de Janeiro**, p. 04-23, 1995.

MARCONDES, E. **Desnutrição**. São Paulo: Savier, 1976.

MARTIN, L.J.; BRAMBRINK, A.M.; PRICE, A.C.; KAISER, A.; AGNEW, D.M.; ICHORD, R.N.; TRAYSTMAN, R.J. Neuronal death in newborn striatum after hypoxia-ischemia is necrosis and evolves with oxidative stress. **Neurobiology of disease**, n. 7(3), p. 169-91, 2000.

MCLEAN, C.; FERRIERO, D., Mechanisms of Hypoxic–Ischemic Injury in the Term Infant. **Seminars of Perinatology**. n. 28, p. 425-432, 2004.

MELLO, M.A.R.; CURY, L. Maternal adaptations for fetal growth in young malnourished rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 21, p. 1053-1056, 1988.

MONTANHA-ROJAS, E.A.; FERREIRA, A.A.; TENÓRIO, F.; BARRADAS, P.C. Myelin basic protein accumulation is impaired in a model of protein deficiency during development. **Nutritional Neuroscience**. v.8, p.49–56, 2005.

MONTGOMERY, .C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of comparative and physiological phisicology**. n. 48(4), p. 254-260, 1955.

MORGAN, B.L. & WINICK, M. The subcellular localization of administered N acetylneuraminic acid in the brains of well-fed and protein restricted rats. *The British Journal of Nutrition*, n. 46(2), p. 231-8, 1981.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.J.; BRONZINO, J.D.; TONKISS, J.; GALLER, J. Malnutrition and the developing central nervous system. In: ISSAACSON, R.L.; JENSEN, K.F. **The Vulnerable Brain and Enviromental Risks: The Malnutrition and Hazard Assessment**. New York: Plenum Press, v. 1, p. 03-43, 1992.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, n. 17(1), p. 91-128, 1993.

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

OKITOLONDA, W.; BRICHARD, S.M.; HENQUIN, J.C. Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. **Diabetologia**, n. 30(12), p. 946-51, 1987.

OLORUNSOGO, O.O. Changes in brain mitochondrial bioenergetics in protein-deficient rats. **British Journal of Experimental Pathology**, n. 70(6), p. 607-19, 1989.

OLORUNSOGO, O.O. Defective mitochondrial cation transport during dietary protein deficiency in rats. **African journal of medicine and medical sciences**, n. 21(1), p. 23-31, 1992.

PALMER, C., VANNUCCI, R.C., TOWFIGHI, J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. **Pediatric research**, n. 27, p. 332-336, 1990.

PALMER, A.A.; PRINTZ, D.J.; BUTLER, P.D.; DULAWZ, S.C.; PRINTZ, M.P. Prenatal protein deprivation in rats induces changes in prepulse inhibition and NMDA receptor binding. **Brain Research**, n. 996, p.193-201, 2004.

PASSOS, M.C.F.; RAMOS, C.F.; MOURA, E.G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutritional Research**, n. 20(1), p. 1603-12, 2000.

PAXINOS, G. & WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates (2ª edição). **Sydney: Academic Press**, 1986.

PENELA-VELEZ DE GUEVARA, M.T.; GIL-LOPEZ, S.B.; MARTIN-PUERTO, M.J.; ROMERO-ESCOS, M.D.; HERRERA-MARTIN, M.; URBON-ARTERO, A. A descriptive study of perinatal asphyxia and its sequelae. **Reviews of Neurology**, n. 43, p. 3-6, 2006.

PEREIRA, L.P.; ARTENI, N.S.; PETERSEN, R.C.; ROCHA, A.P.; ACHAVAL, M.; NETTO, C.A. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, p. 101–108, 2007.

PEREZ-POLO, J.R. Methods in neuroscience. **San Diego: Academic Press**, v. 30, p.243–59, 1996.

PERLMAN, J.M. Intrapartum hypoxic-ischemic cerebral injury and subsequent cerebral palsy: medicolegal issues. **Pediatrics**, n. 99, p. 851-859, 1997.

PIETÁ DIAS, C.; MARTINS DE LIMA, M.N.; PRESTI-TORRES, J.; DORNELLES, A.; GARCIA, V.A.; SICILIANI SCALCO, F.; REWSAAT GUIMARÃES, M.; CONSTANTINO, L.; BUDNI, P.; DAL-PIZZOL, F.; SCHRÖDER, N. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. **Neuroscience**, n. 46(4), p. 1719-25, 2007.

PINE, A.P.; JESSOP, N.S.; ALLAN, G.F.; OLDHAM J.D. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. 3 .The effects of dietary protein restriction and stages of lactation on milk composition. **The British Journal of Nutrition**. V. 72(6), p. 815-30, 1994.

POLLITT, E.; GORMAN, K.S.; ENGLE, P.L.; MARTORELL, R.; RIVERA, J. Early supplementary feeding and cognition: effects over two decades. **Monographs of the Society for Research in Child Development**, v. 58, p. 01-122, 1993.

PRANDINI, M.N.; NEVES, A.; LAPA, A.J.; STAVALE, J.N. Mild hypothermia reduces polymorphonuclear leukocytes infiltration in inducer brain inflammation. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**. v. 63, p. 779-784, 2005.

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

REED, M.G. & HOWARD, C.V. Surface-weighted star volume: concept and estimation. **Journal of Microscopy**. v. 190 (Pt 3), p. 350-356, 1998.

RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Annals of Neurology**, v. 9, p. 131–141, 1981.

RIMPILAINEN, J.; POKELA, M.; KIVILUOMA, K.; ANTTILA, V.; VAINIONPÄÄ, V.; HIRVONEN, J.; OHTONEN, P.; MENNANDER, A.; REMES, E.; JUVONEN, T. Leukocyte filtration improves brain protection after a prolonged period of hypothermic circulatory arrest: a study in a chronic porcine model. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 120, p. 1131-1141, 2000.

ROCINHOLI, L.F.; ALMEIDA, S.S.; DE-OLIVEIRA, L.M. Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, n. 30, p. 407-413, 1997.

RODRIGUES, A. L.; ARTENI, N. S.; ABEL, C.; ZYLBERSZTEJN, D.; CHAZAN, R.; VIOLA, G. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Brain Research**, v. 1002, p. 94–99, 2004.

ROSSITER, J.P.; ANDERSON, L.L.; YANG, F.; COLE, G.M. Caspase 3 activation and caspase like proteolytic activity in human perinatal hypoxic-ischemic brain injury. **Acta Neuropathology**, v. 103 (1), p. 66-73, 2002.

ROTTA L.N.; SCHMIDT A.P.; MELLO E SOUZA T.; NOGUEIRA C.W.; SOUZA K.B.; IZQUIERDO I.A. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. **Neurochemistry Research**, n. 28, p. 1181– 1186, 2003.

ROUGEMONT, M.; DO, K.Q.; CASTAGNE, V. New model of glutathione deficit during development: Effect on lipid peroxidation in the rat brain. **Journal of neuroscience research**, n. 70, p. 774-783, 2002.

SARNAT, B.B. & SARNAT, M.S. Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. **Archives of Neurology**, n. 33, p. 696, 1976.

SCHONHEIT, B. & HAENSEL, P. Effect of nonspecific malnutrition on spine morphology of lamina V pyramidal cells of the cingulate area of juvenile and adult rats. **Journal Hirnforsch.** v. 25:p. 617–631, 1984.

SCHÜRCH, B. Malnutrition and behavioral development: the nutrition variable. **The Journal of Nutrition**, n. 125, p. 2255s-2262s, 1995.

SCHWEIGERT, I.D.; DE OLIVEIRA, D.L.; SCHEIBEL, F.; DA COSTA, F.; WOFCHUK, S.T.; SOUZA D.O.; PERRY, M.L. Gestational and postnatal malnutrition affects sensitivity of young rats to picrotoxin and quinolinic acid and uptake of GABA by cortical and hippocampal slices. **Brain Research**. n.154, p.177-85, 2005.

SCRIMSHAW, N.S. & GORDON, J.E. (ED.). Malnutrition, learning and Behavior. **M.I.T. Press, Cambridge, MA**, p. 566, 1968.

SINGH, T.D.; SHANKAR, R. Developmental regulation and effect of early undernutrition on phosphorylation of rat cortical synaptic membrane proteins. **Internacional Journal of Developmental Neuroscience**, n. 17, p. 743–751, 1999.

SIQUEIRA, I. R.; FOCHESSATTO, C.; TORRES, I.L.S. ; DALMAZ, C.; NETTO, C.A. Aging affects oxidative state in the hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 3, p. 271-278, 2005.

SMART, J.L.; DOBING, J.; ADLARD, B.P.F.; LYNCH, A; SANDS, J. Vulnerability of developing brain: relative effects of growth restriction during the fetal and suckling periods on behavior and brain composition of adult rats. **Journal of Nutrition**. v. 103, p. 1327-1338, 1973.

SMITH, C.A. Effects of maternal undernutrition upon newborn infants in Holanda (1944-5). **Journal of Pediatrics**, v. 30, p. 229-43, 1947.

SOUZA, F. Fatores de risco associados à asfixia perinatal no Brasil. **Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz**; 2003.

SPARRE, T.; REUSENS, B.; CHERIF, H.; LARSEN, M.R.; ROEPSTORFF, P.; FEY, S.J.; LARSEN, P.M.; REMACLE, C.; NERUP, J. Intrauterine Programming of Fetal Islet Gene Expression in Rats – Effects of Maternal Protein Restriction During Gestation Revealed by Proteomic analysis. **Diabetologia**; n. 46, p. 1497-1511, 2003.

STADTMAN, E.R.; OLIVER, C.N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. **Journal of Biology and Chemistry**, n. 266, p. 2005-2008, 1991.

STEIGER, J.L.; GALLER, J.R.; FARB, D.H.; RUSSEK, S.J. Prenatal protein malnutrition reduces beta(2), beta(3) and gamma(2L) GABA(A) receptor subunit mRNAs in the adult septum. **European Journal of Pharmacology**, n. 446, p. 201–202, 2002.

SUSSER, E.; NEUGEBAUER, R.; HOEK, H.W.; BROWN, A.S.; LIN, S.; LABOVITZ, D.; GORMAN, J.M. Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. **Archives of General Psychiatry**. n. 53, p. 25-31, 1996.

SUSSER, E.S. & LIN, S.P. Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945. **Archives of General Psychiatry**. n. 49, p. 983-988, 1992.

TAMARIN, A. The effect of inanition on the submandibular salivary glands and exocrine pancreas of the rat. **Annals of New York Academy Science**. v. 106, p. 609-624, 1963.

TANER, E.M. & FINN-STEVENSON, M. Nutrition and brain development: social policy implications. **American Journal of Orthopsychiatry**. v. 72(2), p. 182-193, 2002.

TAPPEL, A.L. Lipid peroxidation damage to cell components. **Federation proceedings**, n. 32, p. 1870-1874, 1973.

TELEP, J. Regulation of caspase 9 activity by 3 nitrotyrosine in vitro in the cerebral cortex of newborn piglets. **Suppl Pediatric Research Pediatric Academic Societies annual meeting**, v. 51 (4), 2002.

TOMKINS, A. Nutrition and maternal morbidity and mortality. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 85: p. 93-99, 2001.

TONKISS, J.; TRZCINSKA, M.; SCHULTZ, P.; VINCITORE, M.; GALLER, J.R. Prenatally protein malnourished rats are less sensitive to the amnestic effects of medial septal infusions of chlordiazepoxide. **Behavioral Pharmacology**, n. 11, p. 437-446, 2000.

TONKISS, J.; ALMEIDA, S.S.; GALLER, J.R. Prenatally malnourished female but not male rats show increased sensitivity to MK-801 in a differential reinforcement of low rates tasks. **Behavioral Pharmacology**, n. 9(1), p49-60, 1998.

TONKISS, J.; HARRISON, R.H.; GALLER, J.R. Differential Effects of Prenatal Protein Malnutrition and Prenatal Cocaine on a Test of Homing Behavior in Rat Pups. **Physiology and Behavior**. v. 60, p. 1013-1018, 1996.

TORUN, B. & CHEW, F. Protein-energy malnutrition. In Shils, M.; Olson, J.A.; shike, M. (eds) **Modern Nutrition in Health and Disease**, v.2, Philadelphia: Lea & Febiger., p.950-976, 1994.

TRUSWELL, A.S. Protein versus energy in protein energy malnutrition. **South African Medical Journal**, v. 59, p. 753-756, 1981.

VANNUCCI S.J. & HAGBERG H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. **Journal of Experimental Biology**. n. 207p. 3149-3154, 2004.

VANNUCCI, R.C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. **American Journal of Perinatology**. v.17, p.113-120, 2000.

VANUCCI, R.C. & VANNUCCI, S.J. A model of Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. **Annals of the New York Academy of Science**, p. 234-249, 1997.

VANNUCCI, R.C. & VANNUCCI, S.J. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. **Developmental Neuroscience**. n. 27, p. 81-86, 2005.

WALTON, M.; CONNOR, B.; LAWLOR, P.; YOUNG, D.; SIRIMANNE, E.; GLUCKMAN, P.; COLE, G.; DRAGUNOW, M. Neuronal Death and Survival in Two Models of Hypoxic-Ischemic Brain Damage. **Brain Research reviews**, n. 29, p. 137-168, 1999.

WANG, J.L.; STONER, G.D.; BRAY, T.M. Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein-malnourished rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 13, p. 625-633, 2002.

WATERLOW, J. C. Kwashiorkor revisited: the pathogenesis of edema in kwashiorkor and its significance. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 436-441, 1984.

WATERLOW, J. C. Protein-Energy Malnutrition. **London, Edward Arnold**, 1992.

WEISS, L.C. & FELDON, J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. **Psychopharmacology**, n. 156, p. 305-326, 2001.

WEITZDOERFER R.; POLLAK A.; LUBEC B. Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. **Seminars of Perinatology**, n. 28, p. 249-256, 2004.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.

WERNER, E.E. A longitudinal study of perinatal risk. In: FARRAN, D.C.; MCCKINNEY, J. Risk in intellectual and psychosocial development. **New York: Academic Press**, 1986.

WEST, M. J.; SLOMIANKA, L.; GUNDERSEN, H.J.G. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **The Anatomical Record**, v. 231, p. 482-497, 1991.

WHO. The global burden of disease, 2004. update (2008).

WHO/FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Eradicating world hunger – key to achieving the Millennium Development Goals. The State of Food Insecurity in the World, Rome, 2005.

WHO/FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Incorporating Nutrition: Considerations into Development Policies and Programmers Brief for Policy-makers and Programme. Planners in developing countries nutrition Planning ,assessment and evaluation service food and nutrition division food and agriculture organization of the united nations. Rome, 2004.

WHO. The World Health Report 2003: Shaping the Future. Geneva: World Health Organization; 2003.

WILLIAMS L.J. & LUCCI A.P. Placental examination can help determine cause of brain damage in neonates. **Texas Medicine**, v. 86 (1): p. 33-38, 1990.

WOODALL, S.M.; BREIER, B.H.; JOHNSTON, B.M.; GLUCKMAN, P.D. A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal. **Journal of Endocrinology**, n. 150, p. 231-242, 1996.

WU, G.; FAN, Y.Z.; YAN, S.; LUPTON, J.; TURNER, N. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. **The Journal of Nutrition**, n. 134, p. 489-92, 2004.

YAGER, J.Y. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. **Seminars of Pediatric Neurology**. .v. 11, p. 31-46, 2004.

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. **Methods in Molecular Biology**, v. 108, p. 101-106,1998.

ZHU, C.; WANG, X.; CHENG, X.; QIU, L.; XU, F.; SIMBRUNER, G.; BLOMGREN, K. Post- ischemic hypothermia induced tissue protection and diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxiaischemia. **Brain Research**. v. 996, p. 67-75, 2004.