

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

JULIANA ANTOLA PORTO

EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

EM RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO

PRECOCE E CRISES CONVULSIVAS:

AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL

Porto Alegre, 2010.

JULIANA ANTOLA PORTO

EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM RATOS

SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PRECOCE E CRISES

CONVULSIVAS: AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Medicina-Neurociências.

Orientadora: Professora Dra Magda Lahorgue Nunes

Porto Alegre, 2010.

JULIANA ANTOLA PORTO

EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM RATOS

SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PRECOCE E CRISES

CONVULSIVAS: AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Medicina-Neurociências.

Aprovado em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Juliana Bonini

Prof. Dr. Luís Fernando Garcias da Silva

Prof. Dr. Martin Cammarota

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha adorada irmã Fernanda, “sempre juntas”, apesar das nossas pós-graduações nos levarem a continentes diferentes;

e aos nossos amados pais, Cristina e Amaro, que desde cedo nos plantaram a semente do aprendizado, nos estimulando com perguntas e “nunca nos deixando sem respostas”, cultivando a busca do conhecimento constante: “El saber no ocupa lugar...”

Obrigada por sermos essa família tão linda. Obrigada pelo incentivo, pela confiança, pelo apoio e pelo amor incondicional. Essa conquista é nossa.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Magda Lahorgue Nunes pelo apoio e incentivo. Por ter me acompanhado desde o início na vida acadêmica e científica, me orientando desde bolsista de iniciação científica e nas primeiras palestras e apresentações em congressos. Agradeço pelo exemplo profissional, pela confiança, pela oportunidade e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa por disponibilizar o laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUCRS, por presidir o Instituto do Cérebro (INSCER) e o serviço de neurologia da PUCRS, possibilitando o aprendizado e o aperfeiçoamento clínico e científico de muitos profissionais.

Ao Prof. Dr. Ivan Izquierdo e ao Prof. Dr. Martin Cammarota por disponibilizarem o Centro de Memória do IPB da PUCRS, e por dividirem comigo seu tempo para discutirmos ciência.

À minha família, pelo incentivo e presença constante, em especial a minha querida avó Maria e minha abuela Nahir, exemplos de sabedoria e força. Ao meu avô Marcos, a pessoa mais sábia e brilhante que conheci. Ao meu pai Amaro, pela indispensável ajuda na formatação e revisão deste; a minha querida madrinha Janise, pelo exemplo e pelo auxílio nas referências bibliográficas; ao meu querido primo Rodrigo pelo auxílio na revisão da língua portuguesa, e aos meus queridos tios e primos.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Neurociências, em especial à Daniela Abreu, Mariana Florian, Mariana Santos, Ricardo Breda, Samuel Greggio, Simone Salamoni e Zuzete Pires pelo apoio técnico essencial e convívio sempre agradável.

Aos queridos colegas e amigos do Centro de Memória, em especial à Clarice Borges, Janine Rossato, Jociane Myskiw, Juliana Bonini, Ramon Lima, Wéber Cláudio da Silva, pela amizade, acolhimento e suporte científico.

Ao colega e amigo Cristiano Köhler, pelos ensinamentos, pela paciência, pelas tantas horas que passamos na revisão e discussão dos resultados e na elaboração dos gráficos, por toda ajuda e dedicação que foi certamente indispensável.

Ao Prof. Dr. Mário Wagner, pelos ensinamentos e pelo fundamental auxílio na análise estatística e na elaboração das tabelas deste trabalho.

Às minhas queridas amigas, irmãs que escolhi, por entenderem minha ausência no nosso precioso convívio enquanto da elaboração deste, em especial à Andrea Magalhães, Carolina Aydos, Carolina Portinho, Camila Camozzato, Fabiana Dornelles, Karine Bortoluzzi, Lisiane Romani, Marta Lisboa, Paula Vieira e Gabriela Devenz, esta esperando o querido Enzo, meu afilhado.

À minha querida colega Marta Hemb, pela ajuda, incentivo e amizade, tão importantes e tão sentidos nos momentos de ausência.

Aos bolsistas: Ana Gáudio, Andréa Largura e Tomás Adam pelo interesse e pela ajuda durante a realização dos experimentos.

À Capes e aos meus pais, por financiarem minha pós-graduação.

À FAPERGS e ao CNPq, por financiarem o experimento.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1	DESNUTRIÇÃO.....	3
2.1.1	Desnutrição e desenvolvimento cerebral.....	4
2.1.2	Desnutrição e alterações cerebrais.....	5
2.2	EPILEPSIA E CRISES CONVULSIVAS.....	8
2.2.1	Crisis convulsivas e desenvolvimento cerebral.....	10
2.2.2	Crisis convulsivas e alterações cerebrais.....	11
2.3	MEMÓRIA.....	12
2.4	DESNUTRIÇÃO E MEMÓRIA.....	13
2.5	EPILEPSIA E MEMÓRIA.....	15
2.6	DESNUTRIÇÃO, EPILEPSIA E MEMÓRIA.....	17
2.7	ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL (EA).....	18
2.7.1	Utilização do EA em estudos neurológicos.....	21
2.7.2	Efeitos do EA no cérebro.....	21
2.7.3	Efeitos do EA na cognição e memória.....	22
2.7.4	EA , desnutrição e crises convulsivas.....	23
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	GERAL.....	25
3.2	ESPECÍFICOS.....	25
4	METODOLOGIA.....	26
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	26
4.2	PARADIGMA DE DESNUTRIÇÃO.....	27
4.3	MODELO DE CRISES CONVULSIVAS.....	28
4.4	MODELO DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL.....	29
4.5	LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS – LAM.....	31
4.5.1	Aprendizado espacial no LAM.....	32
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4.7	CÁLCULO AMOSTRAL.....	34
4.8	ASPECTOS ÉTICOS.....	34
5	RESULTADOS.....	35

5.1	ANÁLISE DO PESO CORPORAL	35
5.1.1	Efeito do estado nutricional e das crises convulsivas no peso corporal em P15	35
5.1.2	Efeito do estado nutricional, das crises convulsivas precoces e do enriquecimento ambiental no peso corporal em P90.....	36
5.1.3	Efeito do estado nutricional, do status epilético e do enriquecimento ambiental no peso corporal em P90	38
5.2	ANÁLISE DO PESO CEREBRAL.....	41
5.2.1	Efeito do estado nutricional, das crises convulsivas precoces e do enriquecimento ambiental no peso cerebral em P90	41
5.2.2	Efeito do estado nutricional, do status epilético e do enriquecimento ambiental no peso cerebral em P90.....	43
5.3	ANÁLISE DA RELAÇÃO PESO CEREBRAL/PESO CORPORAL.....	45
5.3.1	Efeito do estado nutricional, das crises convulsivas precoces e do enriquecimento ambiental na relação peso cerebral/peso corporal em P90	45
5.3.2	Efeito do estado nutricional, do status epilético e do enriquecimento ambiental na relação peso cerebral/peso corporal em P90.....	47
5.4	ANÁLISE DO LIMIAR PARA CRISES CONVULSIVAS.....	49
5.4.1	Efeito do estado nutricional no limiar para crises convulsivas precoces	49
5.4.2	Efeito do estado nutricional no limiar para status epilético.....	51
5.5	ANÁLISE DA AQUISIÇÃO E RETENÇÃO NA MEMÓRIA ESPACIAL	52
5.5.1	Efeito do estado nutricional, das crises convulsivas e do enriquecimento ambiental na aquisição da memória espacial.....	52
5.5.2	Efeito do estado nutricional, das crises convulsivas precoces e do enriquecimento ambiental na retenção da memória espacial	55
5.5.3	Efeito do estado nutricional, do status epilético e do enriquecimento ambiental na retenção da memória espacial	57
6	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	60
7	CONCLUSÕES	70
8	PERSPECTIVAS	72
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
10	ANEXOS	1

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de enriquecimento ambiental	19
Figura 2	Tipos de moradia para ratos utilizadas experimentalmente	20
Figura 3	Comparação entre ratos Wistar desnutridos e nutridos.	28
Figura 4	Aparato utilizado para indução de crises convulsivas	29
Figura 5	Aparato utilizado como Enriquecimento Ambiental	31
Figura 6	Esquema representativo do LAM	32
Figura 7	Vista geral da sala do LAM	33
Figura 8	Comparação do ganho de peso corporal em P15.....	36
Figura 9	Comparação do ganho de peso corporal em P90 (I).....	38
Figura 10	Comparação do ganho de peso corporal em P90 (II).	40
Figura 11	Representação das curvas de ganho de peso corporal.	41
Figura 12	Comparação do peso cerebral em P90 (I).....	43
Figura 13	Comparação do peso cerebral em P90 (II).	45
Figura 14	Comparação da relação peso cerebral/peso corporal em P90 (I).....	47
Figura 15	Comparação da relação peso cerebral/peso corporal em P90 (II).	49
Figura 16	Comparação do limiar convulsivo em P8, P9 e P10.	50
Figura 17	Comparação de limiar convulsivo em P16.	51
Figura 18	Curvas de aprendizado.....	55
Figura 19	Teste de prova (I).....	57
Figura 20	Teste de prova (II)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Ganho de peso corporal até P15.	35
Tabela 2 Ganho de peso corporal até P90 (I)	37
Tabela 3 Ganho de peso corporal até P90 (II)	39
Tabela 4 Peso cerebral em P90 (I).....	42
Tabela 5 Peso cerebral em P90 (II).	44
Tabela 6 Relação peso cerebral/peso corporal em P90 (I).	46
Tabela 7 Relação peso cerebral/peso corporal em P90 (II).	48
Tabela 8 Limiar para crises precoces em P8, P9 e P10.	50
Tabela 9 Limiar para status epilético em P16.....	51
Tabela 10 (A) - Latência de chegada à plataforma durante o treino sem EA.....	53
Tabela 10 (B) - Comparação da latência de chegada à plataforma durante o treino com EA.	54
Tabela 11 Teste de Prova em P66 (I)	56
Tabela 12 Teste de Prova em P66 (II)	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC	adenosina monofosfato cíclico
CA	cornio de Amon
cm	centímetro
CP	crises precoces
DC	Desnutridos Controles
DPC	Desnutridos Crises Precoces
DSE	Desnutridos Status Epilético
EA	enriquecimento ambiental
EP	erro padrão
g	gramas
GABA	ácido gama amino butírico
GD	giro denteado
h	hora
i.e	isto é
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
LAM	labirinto aquático de Morris
LTP	long term potentiation ou potenciação de longa duração
m	metro
min	minutos
ml	mililitros
NC	Nutridos Controles
NCP	Nutridos Crises Precoces
NMDA	N-Metil D-Aspartato
NSE	Nutridos Status Epilético
NTS	neurotransmissores
P	dia pós- natal
PC	perímetro cefálico
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
QA	quadrante alvo
QI	quociente intelectual
RN	reabilitação nutricional
s	segundos

SE	status epilético
SNC	sistema nervoso central

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do enriquecimento ambiental no aprendizado e memória espacial em ratos submetidos à desnutrição precoce e dois modelos de crises convulsivas: crises precoces recorrentes e status epilético.

Métodos: Filhotes machos de ratos Wistar foram alocados em seis grupos: Nutridos Controles (NC), Nutridos Crises Precoces (NCP), Nutridos Status Epilético (NSE), Desnutridos Controles (DC), Desnutridos Crises Precoces (DCP) e Desnutridos Status Epilético (DSE). Os animais dos grupos DC, DCP e DSE foram mantidos em um regime de privação alimentar do segundo (P2) ao décimo quinto (P15) dia de vida pós-natal. De P8 a P10, os grupos NCP e DCP foram expostos a três crises convulsivas recorrentes por dia, enquanto os grupos NSE e DSE sofreram status epilético em P16, ambos induzidos por flurothyl. A segunda fase do estudo constituiu a repetição da primeira, seguida da exposição dos seguintes animais ao Enriquecimento Ambiental (EA) entre P30 e P60. Após P60 todos os animais foram treinados e testados no Labirinto Aquático de Morris (LAM). Em P90, todos os animais foram sacrificados e os cérebros foram pesados.

Resultados: O EA levou a um benefício significativo na aprendizagem e retenção da memória viso-espacial, sendo capaz de reverter o dano cognitivo gerado pela desnutrição precoce e SE. Houve melhora no tempo despendido no quadrante-alvo em todos os grupos, mas no grupo DCP essa melhora não foi capaz de reverter o dano pré-existente. O modelo de desnutrição utilizado alterou o peso dos animais a partir de P4 e manteve a diminuição significativa até P90, além de levar a efeito deletério no aprendizado no LAM. O limiar para crises precoces foi significativamente menor nos animais desnutridos, enquanto não houve diferença no modelo de status epilético.

Conclusão: O EA é uma forma de tratamento eficaz na recuperação da memória dos animais que sofrem desnutrição precoce e crises convulsivas, sendo capaz de atenuar ou reverter os danos cognitivos gerados por esses agravos.

Descritores: desnutrição, epilepsia, crises convulsivas, enriquecimento ambiental, status epilético, memória viso-espacial.

ABSTRACT

Purpose: Verify the effects of environmental enrichment on spatial learning and memory in rats submitted to early undernourishment and two models of seizures: early recurrent seizures and *status epilepticus* (SE).

Methods: Male offspring of Wistar rats were allocated on experimental groups as follows: Nourished Control (NC), Nourished Recurrent Seizures (NRS), Nourished *Status Epilepticus* (NSE), Undernourished Control (UC), Undernourished Recurrent Seizures (URS) or Undernourished *Status Epilepticus* (USE). Undernourished groups were maintained on a nutritional deprivation regimen from post-natal day 2 (P2) to P15. From P8 to P10, NRS and URS groups were exposed to three recurrent seizures per day, while NSE and USE groups experienced status epilepticus at P16, both induced by flurothyl. The second phase of the study was a repetition of the first, followed by exposure of animals to the environmental enrichment (EE) between P30 and P60. Beginning at P61, all groups were trained and tested in the Morris water maze (MWM). At P90, all animals were sacrificed and their brains were weighed.

Results: Enriched environment led to a significant benefit in learning and retention of visual-spatial memory, being able to reverse the cognitive impairment generated by malnutrition and SE. There was improvement in time spent in target quadrant in all groups, but in the URS group this improvement was not able to reverse the pre-existing damage. The model of undernourishment decreased the weight of the animals from P4 and maintained a significant reduction until P90. In addition lead to deleterious effects on learning in the MWM. The threshold for early recurrent seizures onset was significantly lower in malnourished animals, while there was no difference in the model of status epilepticus.

Conclusion: EE is an effective treatment in the recovery of spatial memory in rats that suffered early undernutrition and seizures, being able to mitigate or reverse the cognitive damage generated by these disorders.

Keywords: undernourishment, epilepsy, seizures, enriched environment, status epilepticus, visual-spatial memory.

1 INTRODUÇÃO

A desnutrição é um problema de saúde pública que leva a grande morbimortalidade. Os países em desenvolvimento abrigam quase a totalidade dos casos de desnutrição mundial (Mello, 2005). No Brasil, a desnutrição ainda é um problema preocupante, principalmente na infância, aparecendo como a principal causa de morbimortalidade em crianças até os 5 anos de idade (Nunes, 2001).

Uma nutrição balanceada e adequada é necessária para a maturação normal do Sistema Nervoso Central (SNC). A desnutrição nos estágios iniciais da vida leva a conseqüências persistentes no desenvolvimento e posterior maturação do SNC, acarretando em danos no aprendizado e no comportamento que persistem até a vida adulta do indivíduo (Almeida, Duntas *et al.*, 2002).

A epilepsia é outra patologia de grande prevalência em países em desenvolvimento. Ademais, trata-se de uma doença de indivíduos jovens, sendo especialmente prevalente na infância (Burneo, Tellez-Zenteno *et al.*, 2005). Sabe-se que o status epilético (SE) acarreta danos cerebrais, visto tanto em estudos clínicos como experimentais. Diversos estudos em ambas as áreas elucidam o efeito das crises convulsivas no cérebro imaturo, mostrando a ocorrência de danos a nível celular e bioquímico, e conseqüentes alterações permanentes cognitivas e comportamentais (Liu, Yang *et al.*, 1999; Holmes, 2004; Cornaggia, Beghi *et al.*, 2006).

Sendo assim, a desnutrição e a epilepsia são prevalentes em nosso meio, especialmente na população pediátrica. Sabe-se que separadamente ambas as patologias acarretam danos no SNC imaturo de forma permanente e persistente, mas desconhece-se o efeito claro da sobreposição dessas duas patologias. Estudos experimentais sugerem uma relação causa-efeito, demonstrando um menor limiar convulsivo em animais desnutridos, por exemplo (Ogura e Orsingher, 1980; Bronzino, Austin-Lafrance *et al.*, 1986). Existem poucos estudos, entretanto, que avaliam a possível interação entre epilepsia e desnutrição no aspecto cognitivo e conseqüente prejuízo no aprendizado e memória. Estudos clínicos em crianças desnutridas apontam maior ocorrência de dificuldade de aprendizado escolar, problemas de memória e alterações comportamentais (Carughi, Carpenter *et al.*, 1989). Em ratos, a desnutrição também predispõe a alterações cognitivas significativas, e conseqüente prejuízo na memória (Lukoyanov e Andrade, 2000).

Desta forma, é necessário buscar formas de reverter os danos conseqüentes a estas patologias. Há diversos estudos buscando fármacos visando melhor controle de crises e uma relativa carência em encontrar formas de reverter especificamente os danos cognitivos decorrentes da desnutrição e de crises convulsivas.

O enriquecimento ambiental (EA) é uma estratégia de modificação ambiental capaz de levar a importantes alterações cognitivas (Nithianantharajah e Hannan, 2006). Há muitos anos a questão de estimulação múltipla vem sendo explorada tanto clínica como experimentalmente. Um estudo clínico com reabilitação de crianças em ambientes enriquecidos como programas suplementares ao tratamento convencional aponta resultados surpreendentes (Carughi, Carpenter *et al.*, 1989). Experimentalmente, o EA leva a ganhos importantes tanto em testes cognitivos quanto a níveis bioquímico e celular, com aumento da camada cortical de certas áreas cerebrais e aumento da neurogênese (Rosenzweig e Bennett, 1996). No campo neurológico o EA já foi estudado como estratégia de tratamento em patologias como isquemia cerebral, trauma, doenças genéticas e neurodegenerativas (Nithianantharajah e Hannan, 2006). Há estudos que elucidam o efeito do EA em epilepsia e em desnutrição separadamente, mas não está claro o efeito deste tipo de intervenção nestas patologias ocorrendo concomitantemente.

Desta forma, o presente estudo visa buscar os efeitos do EA em animais submetidos à desnutrição e a crises convulsivas, avaliando aspectos comportamentais através da testagem da memória espacial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DESNUTRIÇÃO

A desnutrição é definida pela Organização Mundial da Saúde como a condição patológica decorrente da ingestão deficiente ou inadequada de calorias e/ou proteínas em proporções variáveis (Mello, 2005). Os lactentes e pré-escolares compreendem a faixa etária mais atingida pela desnutrição, comumente associada a outras patologias como infecções recorrentes e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (Lombroso, 1996b).

A morbimortalidade associada à desnutrição é maior na infância, e sabe-se que em 40% dos óbitos em crianças menores de 1 ano a desnutrição está associada como causa básica. No Brasil, a desnutrição é a principal causa de morbimortalidade em crianças menores de 5 anos. Estudo realizado em Porto Alegre mostrou que 47% das crianças abaixo desta faixa etária, que utilizam serviço público de saúde, são desnutridas (Tourinho, 1992).

Fatores socioeconômicos estão diretamente relacionados com a prevalência de desnutrição, sendo esta predominante em áreas urbanas, famílias numerosas e de baixa renda. Fatores ambientais como más condições de moradia e saneamento básico e carência de sistemas de saúde adequados contribuem para o aumento da pobreza e de patologias associadas. Tais fatores se somam em países em desenvolvimento, onde se encontra 95% da população desnutrida do mundo. A pobreza é maior causa indireta de desnutrição (Muller e Krawinkel, 2005). Em estudo realizado em Porto Alegre em 1996, avaliou-se a população residente em uma região periférica da cidade. Foi constatado que as famílias que viviam em extrema pobreza apresentavam a mais elevada taxa de mortalidade infantil e de internações hospitalares, fatores envolvidos com a alta prevalência de desnutrição na população estudada (Issler, Giugliani *et al.*, 1996).

A relação entre desnutrição e pobreza é clara, sendo esta última considerada o principal fator etiológico da carência nutricional. Historicamente sabe-se que as crianças constituem o grupo populacional mais afetado, por serem mais vulneráveis e dependentes para acesso ao alimento. Ademais, uma série de fatores perpetua essa condição, dificultando a resolução deste problema. Estão envolvidos aspectos biológicos, psicológicos, econômicos, históricos e socioculturais (Brown e Pollitt, 1996).

Crianças desnutridas apresentam além de maior mortalidade infantil, maior número de comorbidades e maior prevalência de baixo peso ao nascer (Brown e Pollitt, 1996). Dados atuais mostram que existem aproximadamente 115 milhões de crianças menores de 5 anos desnutridas no mundo, sendo cerca de 20 milhões o número de crianças com desnutrição severa. A desnutrição ainda é a principal causa de morte nesta faixa etária, levando a óbito cerca de 6 milhões de crianças por ano diretamente ou por patologias associadas (Who, 2005).

A morbidade secundária à desnutrição é, também, preocupante. Quando ocorre nos períodos precoces, influencia na fase crítica de crescimento e desenvolvimento, podendo levar a danos neurológicos irreparáveis (Dobbing, Hopewell *et al.*, 1971).

2.1.1 Desnutrição e desenvolvimento cerebral

A desnutrição é um problema mundial que afeta milhões de crianças durante o estágio mais vulnerável de desenvolvimento do SNC. Eventos que prejudiquem a maturação cerebral podem resultar em alterações comportamentais, cognitivas e distúrbios de aprendizado e memória (Morgane, Mokler *et al.*, 2002).

O desenvolvimento do SNC segue uma ordem linear e precisa. Na espécie humana, o período crítico de aceleração do crescimento cerebral estende-se da trigésima semana de gestação até o final do segundo ano de vida. Durante este período, apesar da plasticidade neuronal também ser máxima, danos severos podem acarretar alterações permanentes futuras. O estado nutricional é provavelmente o fator ambiental mais importante capaz de influenciar no desenvolvimento do SNC (Morgane, Austin-Lafrance *et al.*, 1993).

A seqüência essencial do desenvolvimento do parênquima cerebral é similar entre os mamíferos. Dessa forma, o estudo do desenvolvimento do SNC em modelo animal é possível, levando-se em conta diversas considerações. Entre as espécies a diferença substancial é o tempo em que a maturação é máxima, podendo ser, grosseiramente, pré ou pós-natal. Nos roedores, tendo em vista seu período gestacional curto, o momento crítico de crescimento cerebral ocorre após nascimento e é mais intenso até as três primeiras semanas de vida (Rodier, 1980; Morgane, Mokler *et al.*, 2002).

O impacto da injúria no cérebro em desenvolvimento depende do período de maturação neurológica em que o organismo se encontra. A concepção de que há momentos em que o SNC é particularmente vulnerável, denominado “período crítico”, possivelmente

não corresponde a apenas um momento, mas a vários, onde mecanismos de suma importância ocorrem para a formação ideal do encéfalo. Conforme Morgane e colaboradores (Morgane, Mokler *et al.*, 2002) esses “momentos críticos” representam espaços de tempo cruciais nos quais a ocorrência de danos implicariam em conseqüências duradouras, por se tratarem de etapas que não podem ser posteriormente repetidas ou postergadas.

Tanto no homem quanto no rato, acredita-se que o efeito da desnutrição tem maior potencial patogênico justamente nesta fase de maior crescimento cerebral. Portanto, o impacto da desnutrição no SNC em desenvolvimento depende tanto da severidade da carência nutricional quanto do período na qual o insulto ocorre (Austin-Lafrance, Morgane *et al.*, 1991; Bronzino, Austin-Lafrance *et al.*, 1991).

Nos seres humanos, o crescimento cerebral atinge seu pico máximo ao final do primeiro ano de vida, quando o cérebro chega a pesar cerca de 70% do peso final que terá no indivíduo adulto. A medida do perímetro cefálico (PC) é de suma importância nessa faixa etária, havendo uma correlação direta com a redução do PC e do peso cerebral (Bolduc e Shevell, 2005). Um estudo clínico avaliando escolares em Porto Alegre em 2001 (Guardiola, Egewarth *et al.*, 2001), contribuiu para elucidar a influência da desnutrição quanto ao desenvolvimento neuropsicomotor. Os autores encontraram comprometimento de funções tais quais: equilíbrio dinâmico e estático, coordenação apendicular, coordenação tronco membro, sensibilidade, gnosis e linguagem em crianças com desnutrição crônica.

2.1.2 Desnutrição e alterações cerebrais

Os primeiros estudos experimentais sobre nutrição e SNC em desenvolvimento datam da década de 60, e demonstravam uma significativa redução do peso cerebral de ratos subnutridos. Desde esta época, os pesquisadores concluíram que o cérebro dos mamíferos é mais vulnerável aos efeitos da restrição nutricional no período de maior aceleração do crescimento cerebral (Dobbing e Sands, 1981). Nos ratos, como já mencionado, o período pós-natal é crítico na maturação das principais estruturas encefálicas, com destaque para a formação do hipocampo. Morgane e colaboradores (Morgane, Austin-Lafrance *et al.*, 1993), entretanto, postularam que o período pré-natal é também de suma importância, pois nele ocorrem as modificações ontogênicas necessárias para o adequado amadurecimento do SNC. Desta forma, não há um consenso entre os pesquisadores sobre o período de maior

vulnerabilidade cerebral nos roedores, mas sabe-se que ambos os momentos (pré e pós-natal precoce) parecem ser cruciais para uma adequada maturação do SNC.

Experimentalmente diversos pesquisadores descreveram alterações cerebrais secundárias à desnutrição. Primeiramente foi observada redução da espessura de áreas corticais (Dobbing, Hopewell *et al.*, 1971; Leuba e Rabinowicz, 1979a). Leuba & Rabinowicz (Leuba e Rabinowicz, 1979a), entretanto, não observaram alteração no número total de neurônios. O mesmo foi relatado por Bedi (Bedi, 1994). Posteriormente, com o avanço das técnicas histológicas, foi demonstrado haver alterações significativas na morfologia, com redução da largura das células piramidais corticais (Levitsky e Strupp, 1995), bem como redução na densidade das espinhas dendríticas do córtex (Sarkar, 1990), e déficits dos neurônios granulares do giro denteado (GD) (Bedi, 1991). Viu-se, ademais, diminuição significativa no número total de células gliais corticais (Leuba e Rabinowicz, 1979a) e diminuição no número total de sinapses no córtex visual do cérebro de animais desnutridos (Warren e Bedi, 1984).

Após a reabilitação nutricional (RN), alguns autores demonstraram haver certa recuperação nas alterações cerebrais, tais como a normalização no número de células gliais corticais (Leuba e Rabinowicz, 1979b; a), e na espessura do córtex (Levitsky e Strupp, 1995). Entretanto, o número reduzido de dendritos nas sinapses não se modificou após a RN (Leuba e Rabinowicz, 1979a). Existem resultados controversos na literatura conforme o modelo de reabilitação alimentar utilizado. Observou-se, por exemplo, recuperação da densidade sináptica nos animais nutricionalmente reabilitados através de amamentação na fêmea nutriz, enquanto a densidade manteve-se menor quando a reabilitação foi efetuada com fórmulas artificiais (Bedi, Massey *et al.*, 1989).

A mielinização cerebral é outro processo que se mostrou alterado nos animais desnutridos, e não houve recuperação após a RN. Tal constatação é de grande importância, uma vez que a transmissão nervosa torna-se lentificada com o déficit de mielinização (Wiggins, Fuller *et al.*, 1984; Royland, Klinkhachorn *et al.*, 1992).

Alterações nas concentrações de neurotransmissores (NTS) foram observadas em alguns estudos. Tanto a desnutrição pré como a pós-natal parecem levar ao aumento dos NTS noradrenalina e serotonina, através do aumento de seu precursor, o triptofano (Wiggins, Fuller *et al.*, 1984; Levitsky e Strupp, 1995). Após a RN as concentrações de NTS podem retornar à normalidade (Levitsky e Strupp, 1995). Entretanto, viu-se que a privação alimentar pode levar a alterações nos receptores dos NTS, levando à conseqüente distúrbio na transmissão

bioquímica. Keller et al (Keller, Cuadra *et al.*, 1990) observaram a redução no número de receptores de noradrenalina em animais desnutridos e posteriormente reabilitados, além de alterações no processo de *down regulation* de receptores adrenérgicos (Keller, Cuadra *et al.*, 1990; Keller, Molina *et al.*, 1990). Tais alterações na dinâmica da transmissão nervosa têm importância nos estudos da resposta desses animais a psicofármacos, como anfetaminas, ansiolíticos e antidepressivos (Molina, Keller *et al.*, 1987; Keller, Molina *et al.*, 1990; Keller, Cancela *et al.*, 1994; Gutierrez e Keller, 1997).

O hipocampo é, provavelmente, a estrutura mais acometida pela carência nutricional. Observaram-se reduções significativas tanto no tamanho das células do GD, quanto nos ramos das espinhas dendríticas das células piramidais (Garcia-Ruiz, Diaz-Cintra *et al.*, 1993). Morgane e colegas (Morgane, Austin-Lafrance *et al.*, 1993) estudaram extensamente a maturação hipocampal. A circuitária de formação segue uma seqüência linear que inicia no córtex entorrinal, segue para as células granulares do GD, daí para as células piramidais da região do corno de Amon 3 (CA3), seguindo para as células piramidais de CA1, de onde se projetam novamente para o córtex entorrinal. Este circuito é modulado por projeções gabaérgicas e por interneurônios locais que estão integradas no complexo processo de formação hipocampal (Morgane, Austin-Lafrance *et al.*, 1993; Morgane, Mokler *et al.*, 2002). Os efeitos no hipocampo secundários à desnutrição incluem redução no tamanho das células do GD e diminuição das ramificações e espinhas dendríticas nos neurônios piramidais (Garcia-Ruiz, Diaz-Cintra *et al.*, 1993). Lukonayov & Andrade (Lukoyanov e Andrade, 2000), estudaram os efeitos da desnutrição tardia em ratos (iniciada aos dois meses de idade), com posterior RN. Os autores observaram redução no número total de células hipocampais no GD, CA1 e CA3. Ademais, relataram perda de 30% das sinapses entre as fibras musgosas e os dendritos das células piramidais de CA3. Esta alteração foi revertida após a RN. As regiões do córtex entorrinal e *subiculum* também são prejudicadas, conforme relataram Andrade e colaboradores em 1998 (Andrade, Madeira *et al.*, 1998).

Estudos sobre a ontogênese cerebral apontam que a regulação da formação hipocampal é influenciada por circuitos extra hipocampais que partem de regiões subcorticais (Morgane, Austin-Lafrance *et al.*, 1993; Morgane, Mokler *et al.*, 2002). São especialmente importantes nesta modulação as vias serotoninérgicas que chegam ao hipocampo terminando em interneurônios inibitórios gabaérgicos. Em animais desnutridos há aumento da transmissão serotoninérgica levando a uma maior inibição gabaérgica. Esse aumento da atividade inibitória gera um déficit na indução e na manutenção dos chamados *long-term*

potentiation (LTP), com conseqüente prejuízo no aprendizado e memória. Bronzino et al demonstraram prejuízo na memória de ratos desnutridos por alterações na formação e manutenção da LTP (Bronzino, Austin-Lafrance *et al.*, 1997). Tal achado está relacionado ao aumento da inibição mediada pelo GABA e a maior dificuldade de induzir e manter a LTP, sendo estes, aparentemente, mecanismos fundamentais que levam à redução da plasticidade no cérebro dos desnutridos (Morgane, Austin-Lafrance *et al.*, 1993).

Estudos clínicos também demonstram alterações semelhantes no cérebro de crianças desnutridas. Winick et al (Winick, 1969) estudaram os cérebros de crianças que foram à óbito por desnutrição em idade precoce e encontraram redução do peso cerebral, do conteúdo de proteínas e ácidos nucleicos e diminuição da mielinização. Os mesmos autores viram também diminuição no volume cerebral e no PC de crianças com desnutrição do tipo marasmo (Winick e Rosso, 1969).

Hales & Barker (Hales e Barker, 1992) estudando as adaptações que o organismo em carência nutricional sofre, propuseram a teoria do “fenótipo econômico”. Quando a oferta de nutrientes é escassa, há uma resposta adaptativa buscando manter o crescimento normal ou próximo à normalidade de órgãos vitais, principalmente o cérebro. Essas adaptações metabólicas aumentariam as chances de sobrevivência no meio adverso, e podem iniciar desde o período pré-natal. Dessa maneira, a desnutrição afeta desproporcionalmente o crescimento corporal e o cerebral, tentando “poupar” este último. Os mecanismos adaptativos, entretanto, não são suficientes para evitar a ocorrência de danos fisiológicos e estruturais quando a escassez de nutrientes chega a certo limite ou se cronifica, levando a diminuição das mitoses, da proliferação e crescimento celular com conseqüente redução do volume cerebral, e advento de inúmeras alterações decorrentes da desnutrição no SNC em desenvolvimento (Ivanovic, Leiva *et al.*, 2004).

2.2 EPILEPSIA E CRISES CONVULSIVAS

Crise convulsiva é uma súbita descarga elétrica nos neurônios do córtex cerebral, capaz de alterar um comportamento ou função. Epilepsia é definida pela presença de crises epiléticas recorrentes não provocadas (Engel, 2006).

As crises convulsivas são classificadas conforme o local de origem cerebral em parciais (focais), quando iniciam em determinada área cortical localizada, ou generalizadas,

quando a descarga elétrica envolve todo o cérebro desde o princípio. As crises parciais podem ser simples ou evoluírem para crises generalizadas, havendo alteração na consciência e sendo, então, chamadas complexas. Quanto ao tempo de duração, as crises podem ser breves, ocorrendo por pouco segundos, até vários minutos ou horas. As crises com duração superior a 30 minutos são chamadas de status epilético. Também chamamos SE quando não há recuperação da consciência entre os intervalos de crises breves (Who, 2001; Engel, 2006).

A epilepsia é uma patologia prevalente, em especial em países subdesenvolvidos. No mundo, a incidência anual de epilepsia varia de 30 a 100 pessoas por 100.000 habitantes, conforme o local estudado, enquanto a prevalência varia de 5 a 10 pessoas por 1.000 habitantes (Who, 2001). No Brasil, as prevalências de epilepsia acumuladas das classes sociais A e B são baixas, semelhantes às encontradas nos países desenvolvidos, enquanto nas classes C e D são mais elevadas, semelhantes às observadas em países em desenvolvimento. No nosso país, a prevalência é de aproximadamente 12/1.000 habitantes (Guerreiro, 2000), enquanto em Porto Alegre é de 16,5/1.000 (Fernandes, 1993). Estratificando esses dados por faixa etária, observa-se que a maior incidência de epilepsia ocorre na população jovem. Até os 20 anos 90% dos indivíduos que serão epiléticos já iniciaram com crises. Nas crianças, 60% têm a primeira crise até os três anos, sendo a maior parte no primeiro ano de vida (Aicardi, 1988).

No período neonatal as convulsões são a manifestação neurológica mais freqüentemente observada, ocorrendo entre 0,2 e 1,4% dos casos e podem estar associadas a múltiplos fatores etiológicos (Lombroso, 1983; Aicardi, 1988; Lombroso, 1996a). Este período é também uma fase de maior suscetibilidade ao desenvolvimento de convulsões (Lombroso, 1996b). Nunes e colaboradores colocam que crises prolongadas no cérebro em maturação aumentam não somente o risco de crises convulsivas subsequentes, como o de desenvolvimento de epilepsia posterior (Nunes, Liptakova *et al.*, 2000). Garcias Da Silva et al (Garcias Da Silva, Nunes *et al.*, 2004), em estudo de coorte de recém-nascidos com crises convulsivas realizado em Porto Alegre entre 1987 e 1997, avaliaram 158 crianças que apresentaram duas ou mais crises no período neonatal. No seguimento, a porcentagem de epilepsia nestas crianças foi de 22% em 12 meses e de 33,8% em 48 meses. Outros estudos colocam a ocorrência de epilepsia após crises neonatais variando em freqüência de 3,5 a 50%, e enfatizam a associação dessas crises com deficiências neurológicas permanentes futuras (Lombroso, 1983; Scher, 2003).

A ocorrência de SE também é mais prevalente em crianças, com cerca de 50% dos casos acontecendo em crianças antes dos 2 anos de idade (Shinnar, Pellock *et al.*, 1997). Além disso, há evidências de que, apesar do cérebro imaturo ser mais resistente aos danos cerebrais secundários ao SE que o maduro, há maior suscetibilidade à reorganização plástica, nem sempre benéfica, bem como para futuros danos cognitivos (Lado, Laureta *et al.*, 2002; Stafstrom, 2002).

Experimentalmente, Moshé & Albala (Moshe e Albala, 1983), avaliaram as alterações maturacionais pós-ictais e a suscetibilidade às crises convulsivas em ratos jovens e demonstraram que a probabilidade de desenvolver crises na idade adulta está diretamente relacionada com a história de crises no período inicial da vida.

2.2.1 Crises convulsivas e desenvolvimento cerebral

O cérebro humano em desenvolvimento é mais predisposto a gerar crises convulsivas (Aicardi, 1988), devido a inúmeros fatores como o desequilíbrio nos NTS inibitórios e excitatórios, com predomínio da atividade destes últimos. Isso decorre da diminuição dos NTS inibitórios, de uma maior facilitação à propagação do impulso elétrico (Moshe e Albala, 1983), além do fato de que alguns NTS inibitórios no cérebro maduro desencadeiam atividade excitatória no cérebro imaturo (Cherubini, Gaiarsa *et al.*, 1991).

Em revisões clínicas viu-se redução do volume cerebral total secundariamente à epilepsia, estimado através da medida do PC (Amiel-Tison, Gosselin *et al.*, 2002), ou pela análise de exames de imagem (Liu, Lemieux *et al.*, 2005). Foi, ademais, demonstrada redução significativa no PC de crianças internadas em unidade de tratamento intensivo neonatal com diagnóstico de epilepsia (Bolduc e Shevell, 2005). Este achado é relevante sabendo-se que há relação direta entre o PC e o crescimento cerebral, bem como com o peso, volume e conteúdo protéico do encéfalo (Amiel-Tison, Gosselin *et al.*, 2002).

Estudos experimentais demonstraram redução do peso cerebral em animais que sofreram crises convulsivas induzidas flurothyl (Wasterlain, 1976), ou por outros modelos epileptogênicos (White, 2002; Nairismagi, Pitkanen *et al.*, 2006).

2.2.2 Crises convulsivas e alterações cerebrais

No animal adulto, a ocorrência de SE leva à perda hipocampal na região de CA1, CA3 e GD (Ben-Ari, 1985). A fisiopatologia desse processo envolve o influxo de cálcio para o meio intracelular, uma vez que o excesso de impulsos excitatórios atua nos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) cálcio-dependentes. O cálcio no meio intracelular desencadeia uma cascata bioquímica e uma série de eventos que podem levar à morte celular (Marks, Friedman *et al.*, 1996).

Alterações na rede glutamatérgica também estão relacionadas a possíveis danos neuronais. O glutamato é o neurotransmissor excitatório predominante do sistema nervoso de mamíferos, relacionado ao aprendizado e memória e é abundante na circuitária hipocampal (Izquierdo e Medina, 1997). Viu-se que o glutamato, ademais, desempenha papel crucial no início e manutenção de crises convulsivas. Sua liberação pronunciada leva à ativação de receptores NMDA e receptores metabotrópicos, desencadeando mecanismos que provocam toxicidade celular e que podem culminar em morte neuronal durante a crise convulsiva prolongada (Millan, Chapman *et al.*, 1993).

No rato imaturo, alguns autores postulam menor vulnerabilidade cerebral ao dano secundário ao SE que nos cérebros de ratos maduros. Verificou-se menor influxo de cálcio para o meio intracelular e conseqüente menor dano à célula (Marks, Friedman *et al.*, 1996), mais resistência à injúria celular na transmissão sináptica quando expostos à anóxia (Cherubini, Ben-Ari *et al.*, 1989), menor propensão ao dano celular decorrente de crises convulsivas (Sankar, Shin *et al.*, 1998), e mais resistência aos efeitos tóxicos do glutamato (Liu, Stafstrom *et al.*, 1996), por exemplo. Conforme Holmes e colegas (Holmes, Khazipov *et al.*, 2002), essa diminuição na vulnerabilidade celular deve-se a menor densidade sináptica do cérebro imaturo, bem como ao menor consumo energético e à imaturidade das cascatas bioquímicas que levariam à morte celular. Entretanto, tais fatores não são suficientes para poupar o cérebro imaturo de danos secundários a crises prolongadas (Lado, Laureta *et al.*, 2002).

Ainda no cérebro imaturo, crises recorrentes nas primeiras semanas de vida aparentemente não levaram em perda celular, mas associaram-se a um extenso brotamento de fibras musgosas em região CA3 do hipocampo (Riviello, De Rogalski Landrot *et al.*, 2002), bem como a neurogênese no GD (McCabe, Silveira *et al.*, 2001).

2.3 MEMÓRIA

Memória é a capacidade de armazenar informações para posterior recuperação. O acervo de memórias de cada um faz com que sejamos indivíduos únicos, com a capacidade de registrar e armazenar nossas próprias experiências (Izquierdo, 2002).

O processo de formação de memória envolve as etapas de aquisição, formação, conservação e evocação. Quanto à natureza, a memória pode ser classificada em explícita ou declarativa e implícita ou não-declarativa. A memória declarativa reúne tudo que podemos evocar de modo consciente. Ela divide-se em episódica ou semântica; a primeira, também chamada de autobiográfica, refere-se a eventos vividos pelo indivíduo; a segunda, diz respeito aos conhecimentos gerais que independem da experiência pessoal de cada um. A memória não-declarativa, por sua vez, não envolve evocação consciente, referindo-se às memórias de habilidades motoras, aos hábitos, aos aprendizados reflexos e emocionais. A memória para habilidades motoras é também chamada de memória de procedimento ou procedural (Izquierdo, Barros *et al.*, 1998; Izquierdo, 2002).

A memória declarativa e não-declarativa diferem entre si quanto às estruturas anatômicas envolvidas nas suas formações. A memória declarativa requer o funcionamento do córtex entorrinal, parietal, *subiculum*, córtex cingulado anterior e posterior, e hipocampo. A não-declarativa é inicialmente processada pelo hipocampo, seguindo para amígdala, gânglios da base, substância nigra e cerebelo (Albright, Kandel *et al.*, 2000).

Quanto ao tempo de retenção, a memória é classificada como memória de trabalho (imediate), de curta ou de longa duração. A memória de trabalho mantém a informação durante alguns segundos, apenas enquanto a mesma esta sendo utilizada (Baddeley, 2000). Ela depende da atividade do córtex pré-frontal (Izquierdo, 2004). A memória de curta duração é formada de modo rápido (em minutos) e perdura por 3 a 6 horas. Já a de longa duração, forma-se em algumas horas e pode persistir por muitas horas, dias ou anos. A memória que se estende por décadas é um tipo de memória de longa duração denominada memória remota (Kandel, 2001; Izquierdo, 2002).

No momento em que vivenciamos uma experiência, tanto a memória imediata, quanto a de curta e de longa duração iniciam seu processo de formação de forma concomitante.

A memória do ser humano é semelhante a dos outros mamíferos no que concerne aos seus mecanismos essenciais de formação e evocação, às áreas anatômicas envolvidas e seu mecanismo molecular de funcionamento, mas diferem quanto ao seu conteúdo (Izquierdo, 2002).

O conceito de cognição envolve as áreas de atenção, percepção, raciocínio, juízo, imaginação, pensamento, linguagem, aprendizado e memória. O aprendizado é o processo pelo qual obtemos conhecimento do mundo, enquanto que a memória é o processo pelo qual este conhecimento é estocado e mais tarde recuperado (Kandel et al., 1991).

O cérebro dos seres humanos é plástico. Este termo deriva do grego, *plastos*, e refere-se à capacidade de mudança na forma. O SNC tem a habilidade de modificar sua estrutura em resposta a estímulos internos e externos, sendo esta uma capacidade adaptativa de vital importância na sobrevivência e no progresso das espécies. Nos animais, a plasticidade neuronal é essencial nas suas vidas diárias possibilitando contínuas adaptações às alterações do ambiente externo (Kolb e Whishaw, 1998). Bliss & Lomo (Bliss e Lomo, 1973), em 1973, conduziram um experimento *in vivo* em coelhos, onde observaram que a estimulação tetânica da via perfurante das fibras pré-sinápticas levava a uma alta resposta das células granulares dos neurônios pós-sinápticos. Esse efeito foi denominado por eles de potenciação de longa duração (LTP), uma vez que a elevação do potencial pós-sináptico seguiu por um longo período (Bliss e Gardner-Medwin, 1973; Bliss e Lomo, 1973). A LTP é uma forma de plasticidade sináptica que fundamenta o mecanismo neuronal no aprendizado e armazenamento de memória no cérebro (Rogan e Ledoux, 1995). Alguns estudos sobre avaliação do comportamento de animais encontraram alta correlação entre LTP e memória espacial (Deupree, Bradley *et al.*, 1993; Moore, Browning *et al.*, 1993).

2.4 DESNUTRIÇÃO E MEMÓRIA

Os efeitos dos insultos nutricionais no cérebro em desenvolvimento são duradouros e podem levar a deficiências permanentes no aprendizado, na memória e no comportamento. As crianças constituem o grupo social mais vulnerável à desnutrição e seus efeitos deletérios no SNC em desenvolvimento, levando à possível prejuízo cognitivo e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (Dobbing, Hopewell *et al.*, 1971; Morgane, Austin-Lafrance *et al.*, 1993).

Conforme Morgane e colaboradores (Morgane, Mokler *et al.*, 2002) a maturação do SNC de forma a possibilitar o desenvolvimento de uma inteligência adequada, depende de três fatores críticos: diretrizes genéticas ou inatas, estímulos ambientais e nutrição apropriados. A privação nutricional na gestação pré-existente ou durante a infância podem, portanto, prejudicar o desenvolvimento mental e intelectual futuro. Foram comprovados efeitos a longo prazo da desnutrição precoce, tais quais: o crescimento cefálico aquém do esperado, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, diminuição no quociente de inteligência (QI) e maior taxa de insucesso escolar (Stoch, Smythe *et al.*, 1982; Ivanovic, Leiva *et al.*, 2000). Ivanovic et al (Ivanovic, Leiva *et al.*, 2004) correlacionaram a ocorrência de baixo peso e PC abaixo do esperado ao nascimento com pior desempenho escolar e diminuição no QI.

Diversos estudos experimentais demonstram alterações comportamentais secundárias a carências nutricionais, incluindo alterações no comportamento exploratório, em aspectos emocionais e sociais, e na formação e retenção de memória (Jordan, Cane *et al.*, 1981; Fukuda, Francolin-Silva *et al.*, 2002; Fukuda, Francolin-Silva *et al.*, 2007). Como já citado, o hipocampo é uma das principais regiões afetadas pela desnutrição, ocorrendo alterações morfológicas, neuroquímicas e neurofisiológicas (Fukuda, Francolin-Silva *et al.*, 2002). Sendo o hipocampo uma estrutura sabidamente crucial nos processos de memória e comportamento, entendemos mais claramente o meio pelo qual esse processo leva a danos cognitivos.

Experimentalmente, o labirinto aquático de Morris (LAM) é o aparato mais utilizado para avaliação cognitiva de roedores. Através da análise do desempenho de ratos desnutridos no LAM, uma série de trabalhos já foi publicada, demonstrando que tanto os paradigmas desnutrição intra-uterina quanto extra-uterina afetam o aprendizado e a retenção da memória espacial (Jordan, Cane *et al.*, 1981; Huang, Lai *et al.*, 2003).

Lukoyanov & Andrade (Lukoyanov e Andrade, 2000), observaram alterações deletérias da desnutrição nos testes de campo aberto, havendo menor reação emocional, alterações na habituação e maior atividade locomotora. Os autores também verificaram lentificação no aprendizado no LAM, bem como no teste de retenção de memória espacial. Nos animais reabilitados nutricionalmente, tais alterações comportamentais não foram mais observadas.

As alterações deletérias na plasticidade sináptica decorrentes das carências nutricionais são mecanismos críticos que levam ao prejuízo no aprendizado no SNC em

desenvolvimento. As alterações verificadas na capacidade plástica do hipocampo se mantêm mesmo após adequada reabilitação nutricional (Bronzino, Austin-Lafrance *et al.*, 1997). Através da análise da formação e manutenção da LTP, Bronzino e colaboradores (Bronzino, Austin-Lafrance *et al.*, 1991; Bronzino, Austin-Lafrance *et al.*, 1997) demonstraram alterações no cérebro de ratos desnutridos avaliados em P15, P30 e P90, e correlacionaram tais achados fisiopatológicos a alterações na formação de memória.

2.5 EPILEPSIA E MEMÓRIA

O período neonatal é a fase de maior suscetibilidade ao desenvolvimento de convulsões e de epilepsia (Holmes, 2004). A epilepsia na infância, por sua vez, está associada a uma variedade de alterações cognitivas e comportamentais. Foi demonstrado haver risco significativo de ocorrência de diminuição no QI, dificuldade de aprendizado escolar e alterações na memória e no comportamento em crianças epiléticas (Bailet e Turk, 2000). Mesmo nas crianças avaliadas com QI normal, houve maior prevalência de problemas de aprendizado (Bailet e Turk, 2000).

Define-se distúrbios do aprendizado como desordens que interferem com o desempenho acadêmico ou com as atividades diárias que requerem leitura, escrita e habilidades matemáticas em indivíduos com um QI normal (Hemb, 2007). A ocorrência de distúrbios de aprendizado em crianças com epilepsia é maior do que na população de um modo geral. Há relato de que 25% a 50% dos pacientes com epilepsia apresentam algum tipo de distúrbio do aprendizado (Beghi, Cornaggia *et al.*, 2006), sendo prejuízo na memória o problema mais prevalente conforme Strauss e colaboradores (Strauss, Loring *et al.*, 1995). Entre os fatores relacionados a um maior prejuízo na memória, o tempo de duração da epilepsia ativa aparece diretamente relacionado à piora na formação e evocação de memórias (Delaney, Rosen *et al.*, 1980). Hermann et al (Hermann, Jones *et al.*, 2006; Hermann e Seidenberg, 2007) relataram que a ocorrência de crises convulsivas leva à redução do volume cerebral total, além de prejudicarem a capacidade intelectual como já descrito. Diversos fatores associados ao diagnóstico de epilepsia contribuem para a ocorrência de déficits cognitivos. A própria etiologia da epilepsia, o tratamento com as medicações antiepiléticas, a recorrência e a duração das crises são pontos importantes nesse quadro. A questão da recorrência de crises, entretanto, não é clara, e estudos experimentais são importantes para elucidar essa hipótese (Holmes, 2004).

Em modelos experimentais há inúmeras alterações significativas descritas na aquisição e retenção da memória após modelos de crises convulsivas (Lynch, Sayin *et al.*, 2000; Rutten, Van Albada *et al.*, 2002; Liu, Muller *et al.*, 2003). Vários autores confirmaram a observação clínica de que crises prolongadas levam a efeitos deletérios na cognição, memória e comportamento (Dodrill e Wilensky, 1990; Holmes, 1997), além de evidenciarem que as alterações decorrentes de SE dependem da idade na qual as crises são induzidas. Nos animais adultos que sofreram SE há deficiência substancial no aprendizado, memória e comportamento, enquanto nos ratos jovens estas deficiências são mais amenas (Holmes, Chronopoulos *et al.*, 1993; Stafstrom, Chronopoulos *et al.*, 1993; Rice, Floyd *et al.*, 1998). Da mesma maneira Liu et al (Liu, Muller *et al.*, 2003) constataram que a indução de SE precoce (P20) leva a alterações persistentes na performance no aprendizado da memória espacial, testada já na fase adulta. Assim como as crises prolongadas, crises recorrentes também podem ser prejudiciais. Holmes et al (Holmes, Gairisa *et al.*, 1998) provocaram crises convulsivas recorrentes em ratos no período neonatal induzidas pelo flurothyl e observaram alteração significativa quanto a retenção da memória espacial.

Em estudos de epilepsia, bem como nos que avaliam os efeitos da desnutrição conforme citado anteriormente, o hipocampo é novamente apontado como uma estrutura especialmente vulnerável. É válido ressaltar que, sendo o hipocampo uma estrutural crucial nos mecanismos cognitivos, entende-se as razões da elevada prevalência de deficiências de aprendizado e memória associadas à ocorrência de crises convulsivas (Holmes, Khazipov *et al.*, 2002). Estudos eletrofisiológicos na região hipocampal de roedores mostraram que atividades convulsivas repetidas geram um efeito deletério na importante forma de plasticidade sináptica LTP, considerada um dos mecanismos básicos na formação da memória. A atividade epilética induz a LTP de forma anormal alterando a capacidade plástica no hipocampo e, conseqüentemente, o processamento da informação. As crises levam, desta maneira, a prejuízo no aprendizado hipocampo-dependente (Reid e Stewart, 1997; Liu, Muller *et al.*, 2003).

Lynch e colaboradores (Lynch, Sayin *et al.*, 2000) mostraram haver associação entre crises prolongadas precoces e redução da manutenção da LTP, e correlacionaram esse achado de diminuição da plasticidade neuronal com piora no desempenho em teste de memória visoespacial.

2.6 DESNUTRIÇÃO, EPILEPSIA E MEMÓRIA

Desnutrição e epilepsia são problemas comuns em países em desenvolvimento, sendo uma relação causa-efeito sugerida em diversos estudos (Bronzino, Austin-Lafrance *et al.*, 1990; Palencia, Calvillo *et al.*, 1996). Nesses países ocorre uma maior prevalência da coexistência dessas duas patologias, constituindo importante problema de saúde pública (Hackett e Iype, 2001). Apesar da desnutrição não ser uma causa direta de epilepsia sabe-se que pode diminuir o limiar convulsivo (Bronzino, Austin-Lafrance *et al.*, 1986), o que pode contribuir para uma ocorrência maior destes eventos em populações com tais características nutricionais (Nunes, 2001).

Clinicamente há relato de maior incidência de crises em recém-nascidos de baixo peso ao nascer (Lombroso, 1996b). A ocorrência dessas crises no período neonatal pode acarretar alterações na plasticidade cerebral, sendo a expressão clínica de tais alterações variável de um indivíduo para outro, na estreita dependência de fatores genéticos e ambientais. Como vimos, a carência de nutrientes é possivelmente o fator ambiental mais importante nesse contexto (Morgane, Austin-Lafrance *et al.*, 1993).

O hipocampo, cuja circuitária adequadamente funcionante é necessária nos processamento cognitivo, é uma estrutura particularmente vulnerável a insultos precoces (Liu, Muller *et al.*, 2003). Insultos perinatais, como deficiência na ingestão de nutrientes e crises convulsivas, podem alterar a plasticidade e a conformação da circuitária hipocampal, conforme aqui já descrito, de forma independente (Morgane, Mokler *et al.*, 2002). Há poucos estudos, todavia, que verificaram especificamente os efeitos da possível interação entre a desnutrição e as crises convulsivas quanto a danos cognitivos. Huang et al (Huang, Lai *et al.*, 2003) observaram piora significativa na memória espacial de ratos desnutridos e de ratos submetidos a SE, mas não encontraram interação entre esses achados no teste no LAM.

Bronzino et al (Bronzino, Austin-Lafrance *et al.*, 1986) estudaram um modelo de desnutrição precoce seguida de estimulação elétrica por kindling iniciando em P44. Relataram alterações significativas quanto à diminuição do limiar convulsivo nos ratos desnutridos, além de disfunções na resposta elétrica à estimulação das células piramidais de CA1. Ainda relacionando a ocorrência de crises e carências nutricionais, Gitzen et al (Gietzen, Dixon *et al.*, 1996) estudaram ratos com deficiência de aminoácidos essenciais tais como histidina, isoleucina e treonina; quando submetidos a crises por pentylenetetrazol, esses ratos tiveram

menor limiar convulsivo além de piora na severidade das crises (Rosenzweig e Bennett, 1996).

Sabendo a considerável prevalência na população pediátrica da coexistência entre desnutrição e epilepsia, é importante elucidar a possível interação entre esses fatores, a fim de conhecer o processo fisiopatológico e os prejuízos cognitivos subsequentes. Ademais, buscar estratégias para amenizar ou reverter os danos são de suma importância clínica. Experimentalmente, entretanto, há uma relativa escassez de trabalhos com modelos que reproduzam esta situação (Hemb, 2007).

2.7 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL (EA)

O psicólogo canadense Donald O. Hebb, em 1947, foi o primeiro pesquisador a propor o EA experimentalmente. Ele observou que roedores mantidos como animais de estimação apresentavam melhor desempenho cognitivo em comparação aos animais mantidos em laboratório (Nithianantharajah e Hannan, 2006). A partir da década de 1960, outros pesquisadores como Bennet e Rosenzweig (Rosenzweig e Bennett, 1972) introduziram o EA como uma ferramenta científica para estudo do desenvolvimento cerebral. A definição de EA refere-se ao alojamento diferenciado que oferece estímulos físicos e sociais, e é “enriquecido” quando comparado ao alojamento regular (*standart*), habitualmente utilizado nos laboratórios de pesquisa. Nos alojamentos regulares os animais são mantidos em número de 3 a 6, sem objetos no seu interior, exceto maravalha, água e ração. Os diversos modelos de EA variam quanto ao número de animais alocados em cada caixa, geralmente de 5 a 15, proporcionando uma maior interação social e maior estimulação física e sensorial. As caixas moradia utilizadas são maiores e contêm objetos variados no seu interior para livre exploração dos animais. Os objetos podem ou não ser trocados a cada determinado tempo, conforme o protocolo de EA utilizado, e são confeccionados de materiais, formas, tamanhos e cores diversas como bolas, rampas, túneis, abrigos e *running wheels*. O propósito fundamental do EA é proporcionar estímulos sensoriais como visual e tátil, além de promover os campos motor e cognitivo. A figura 1, a seguir, mostra um exemplo de moradia enriquecida em nosso biotério.



Figura 1 Modelo de enriquecimento ambiental proporcionando estímulos visuais, motores, cognitivos e somatossensoriais, localizado no biotério do IPB- PUCRS.

A partir dessa definição do EA surgiu também o conceito de ambiente “empobrecido”, moradia que comporta apenas um animal e sem objetos em seu interior (Kolb e Whishaw, 1998), e também usada com fins comparativos com os ambientes enriquecidos. A figura 2, a seguir, mostra os três tipos de moradia previamente descritos quanto à questão ambiental.

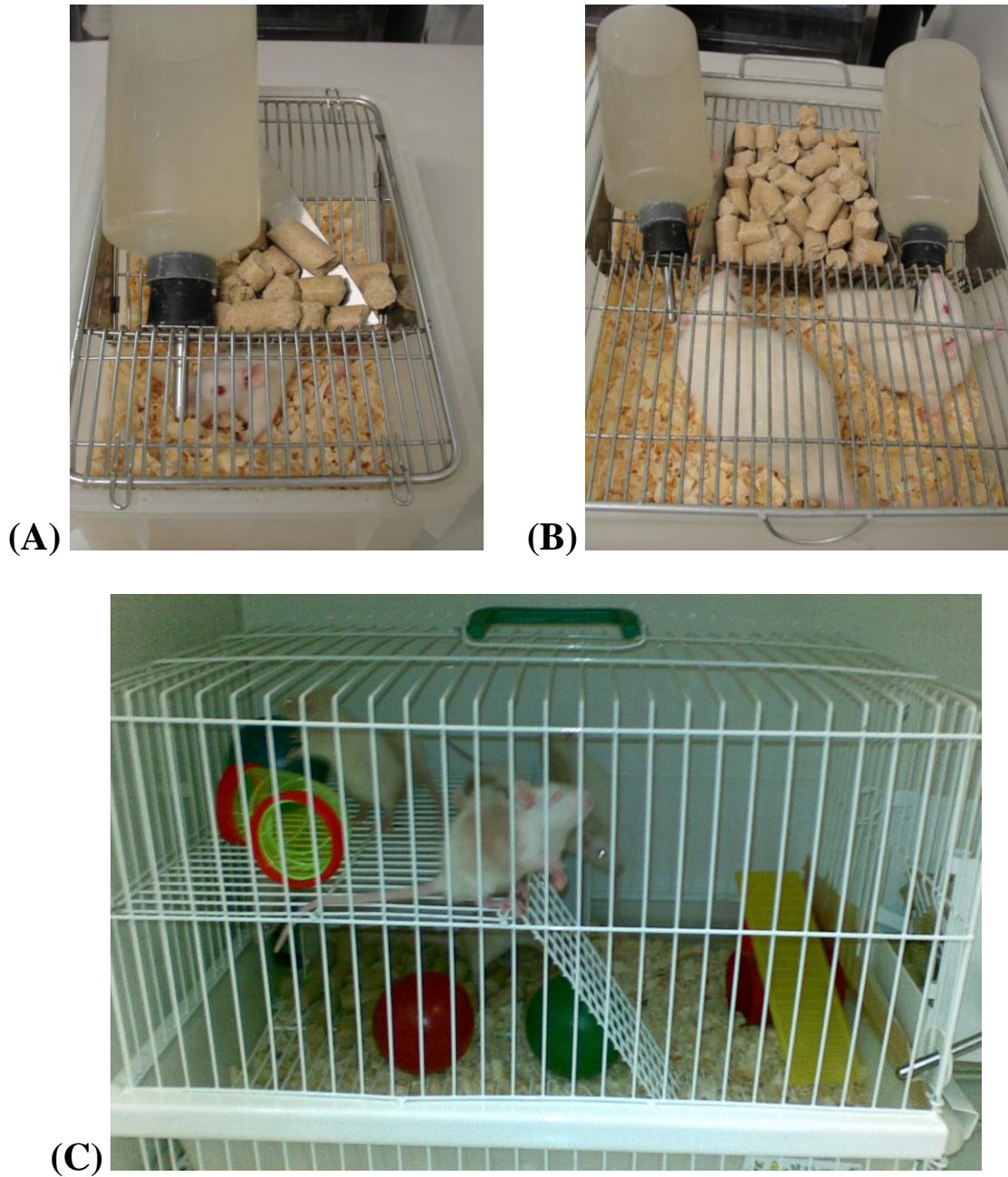


Figura 2 Tipos de moradia para ratos utilizadas experimentalmente no biotério do IPB-PUCRS. (A) Ambiente Empobrecido, comporta somente um animal, sem objetos em seu interior. (B) Moradia regular, comporta geralmente de 3 a 6 animais, sem objetos em seu interior. (C) Ambiente Enriquecido, comporta geralmente entre 5 e 15 animais, contendo objetos estimulatórios em seu interior.

2.7.1 Utilização do EA em estudos neurológicos

O recurso do ambiente enriquecido vem sendo utilizado nas mais diversas patologias neurológicas. Na última década, estudos usando modelos de camundongos *knockout* para doenças genéticas como síndrome do X-frágil (Will, Galani *et al.*, 2004) e camundongos Ts65Dn parcialmente trissômicos, usados como modelo para estudo da síndrome de Down (Martinez-Cue, Baamonde *et al.*, 2002), evidenciam melhora em testes cognitivos quando expostos ao EA. Modelos experimentais para estudo de doenças neurodegenerativas como esclerose lateral amiotrófica (Stam, Nithianantharajah *et al.*, 2008), doença de Parkinson (Jadavji, Kolb *et al.*, 2006) e doença de Alzheimer (Jankowsky, Melnikova *et al.*, 2005), além modelos de ratos transgênicos para doença de Huntington (Van Dellen, Blakemore *et al.*, 2000), mostram diminuição da perda celular encefálica e maior tempo para início dos sintomas motores quando os animais foram expostos ao ambiente enriquecido.

Uma série de estudos relata melhora na recuperação motora e cognitiva dos animais que sofreram injúrias cerebrais isquêmicas e foram submetidos ao EA, além de demonstrarem diminuição da área cortical infartada, aumento nas células progenitoras de astrócitos e oligodendrócitos, bem como de células-tronco neurais (Johansson e Belichenko, 2002; Risedal, Mattsson *et al.*, 2002; Komitova, Mattsson *et al.*, 2005). Nos modelos experimentais em epilepsia o ambiente enriquecido demonstrou aumentar a resistência a crises e diminuir déficits cognitivos associados, além de levar a inúmeras alterações a nível celular (Young, Lawlor *et al.*, 1999; Faverjon, Silveira *et al.*, 2002; Koh, Chung *et al.*, 2005), como veremos especificamente mais adiante.

2.7.2 Efeitos do EA no cérebro

Os primeiros estudos com EA demonstraram a ocorrência de alterações como aumento do peso cerebral e espessamento das camadas corticais, além de aumento na proteína total encefálica (Bennett, Rosenzweig *et al.*, 1969). A seguir, os estudos cada vez mais específicos, apontaram alterações decorrentes do EA a nível bioquímico e celular (Van Praag, Kempermann *et al.*, 2000).

Uma grande variedade de parâmetros de plasticidade foi demonstrada, como aumento da neurogenese (Kempermann, Kuhn *et al.*, 1997; Kempermann e Gage, 1999; Van Praag, Kempermann *et al.*, 2000), da gliogênese e das arborizações dendríticas (Nakamura,

Kobayashi *et al.*, 1999). Kemperman et al (Kempermann, Kuhn *et al.*, 1997) demonstraram aumento da camada granular secundário ao ganho de 15% de neurônios granulares no GD de camundongos submetidos ao EA. Outros autores relataram aumento significativo da densidade sináptica e do número total de sinapses nos animais ambientalmente estimulados (Rosenzweig e Bennett, 1996; Ip, Giza *et al.*, 2002), além de importante aumento da plasticidade cortical relacionada à maior expressão de genes como o gene Arc, envolvido no processo molecular da plasticidade celular (Pinaud, Penner *et al.*, 2001).

Em animais normais o EA foi associado a alterações como a inibição da morte celular por apoptose na região hipocampal e ao aumento de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) e fator de crescimento do nervo (NGF) (Young, Lawlor *et al.*, 1999). Há também aumento da resistência celular a insultos, provavelmente em decorrência do aumento na expressão de RNA mensageiro para esses fatores previamente citados, envolvidos no trofismo celular (Nakamura, Kobayashi *et al.*, 1999). Além disso, diversos autores descreveram que o ambiente enriquecido possui efeito protetor no envelhecimento celular (Nakamura, Kobayashi *et al.*, 1999; Will, Galani *et al.*, 2004; Lores-Arnaiz, Bustamante *et al.*, 2006).

Quanto ao peso cerebral, foi relatado aumento do peso dos cérebros de animais submetidos a diferentes protocolos de EA (Rosenzweig, Krech *et al.*, 1962; Iso, Simoda *et al.*, 2007).

2.7.3 Efeitos do EA na cognição e memória

Estudos com ambiente enriquecido evidenciaram melhora significativa nos testes comportamentais e de memória, provavelmente de forma secundária às alterações anatômicas previamente descritas (Rosenzweig e Bennett, 1996; Brown, Cooper-Kuhn *et al.*, 2003).

Xu e colaboradores (Xu, Ye *et al.*, 2009) estudaram o efeito do EA em ratos Sprague-Dawley submetidos à insulto isquêmico cerebral. O EA teve consequências benéficas nos animais testados no LAM e levou ao aumento do número de sinapses parietais e da densidade pós-sináptica do hipocampo e do córtex parietal.

Veena et al (Veena, Srikumar *et al.*, 2009) demonstraram melhora nos sintomas depressivos concomitantemente ao aumento de células hipocâmpais em ratos Wistar submetidos a estresse crônico seguido de EA.

Na área comportamental demonstrou-se que o EA melhora o desempenho de animais nos mais variados testes cognitivos, sensoriais, motores e afetivos (Rosenzweig e Bennett, 1996; Young, Lawlor *et al.*, 1999; Rutten, Van Albada *et al.*, 2002; Veena, Srikumar *et al.*, 2009), como no LAM (Wang, Lai *et al.*, 2007), na habituação avaliada através do teste de campo aberto (Koh, Chung *et al.*, 2005; Amaral, Vargas *et al.*, 2008), reflexo de sobressalto (Iso, Simoda *et al.*, 2007), labirinto em cruz elevado e labirinto radial de oito braços (Lores-Arnaiz, Bustamante *et al.*, 2007).

Não está claro qual o tempo necessário de exposição ao EA para gerar benefícios e em que momento de início à exposição ocorre maior ganho cognitivo. Amaral et al (Amaral, Vargas *et al.*, 2008) demonstraram que um período curto, de uma semana apenas, já leva a benefícios no campo cognitivo. Os autores também relataram que os benefícios podem perdurar durante vários meses, e que esse tempo é diretamente proporcional ao tempo de exposição ao ambiente enriquecido. Ademais, os pesquisadores enfatizaram que os achados dos efeitos do ambiente enriquecido no cérebro são diversificados, pois há inúmeros modelos de EA, e que variam quanto ao tempo de exposição e de duração e quanto a idade de início da exposição.

2.7.4 EA , desnutrição e crises convulsivas

Animais desnutridos foram submetidos ao EA e verificou-se aumento da espessura cortical nas áreas frontoparietal e occipital, além de aumento na ramificação dendrítica pós-EA (Carughi, Carpenter *et al.*, 1989). Diversos estudos demonstram aumento da massa encefálica de animais desnutridos em decorrência da exposição ao ambiente enriquecido (Bennett, Rosenzweig *et al.*, 1969; Henderson, 1970; Katz e Davies, 1984).

Crnic (Crnic, 1983) observou que o EA provoca importante melhora em testes cognitivos em ratos submetidos a um modelo de desnutrição intra-uterina. Os animais que foram alocados em ambiente enriquecido obtiveram melhor desempenho por aumento do tempo de latência à movimentação em campo aberto e melhores escores no teste de esQUIVA inibitória.

Especificamente em animais que sofreram SE e foram submetidos ao EA, demonstrou-se *up regulation* de múltiplos fatores neurotróficos, aumento da neurogênese na camada granular do GD (Dhanushkodi e Shetty, 2008), aumento da atividade do AMPc e CREB, este último um fator de transcrição que desempenha papel crítico nos processos de memória de longa duração (Holmes, Yang *et al.*, 2002).

Koh e colaboradores (Koh, Chung *et al.*, 2005) induziram crises através da administração de ácido kaínico em ratos Long-Evans entre P20 e P25. A seguir, os animais foram randomizados em moradias regulares ou enriquecidas. Observou-se melhora no desempenho no teste de campo aberto nos animais alocados no grupo submetido ao EA, associada ao aumento da expressão de genes envolvidos na consolidação da memória e na plasticidade sináptica (genes Arc, Homer 1a e Egr 1).

Outro estudo (Rutten, Van Albada *et al.*, 2002) com indução de SE em P20 utilizando o modelo de lítio-pilocarpina e posterior EA, avaliou esses animais quanto à memória espacial em P22, P25, P30 ou P50. Em todos os períodos testados os animais que sofreram SE foram piores que os controles no LAM. Após o tratamento com ambiente enriquecido por 28 dias houve melhora significativa no desempenho na memória visoespacial, porém, sem alterações histológicas ou eletroencefalográficas concomitantes.

Em estudos que submeteram os animais ao ambiente enriquecido antes da indução de crises convulsivas observou-se efeito protetor do EA (Pinaud, Penner *et al.*, 2001), aumentando o limiar para o início da crise e protegendo o cérebro de insultos secundários às crises (Young, Lawlor *et al.*, 1999).

Não encontramos nenhum estudo que elucide os efeitos do ambiente enriquecido em animais desnutridos e submetidos a crises convulsivas. É válido enfatizar novamente a coexistência desses agravos em seres humanos, principalmente em países em desenvolvimento, afetando a população infantil de modo especial. Pensando nisso buscamos desenvolver um modelo experimental que possibilite a avaliação da interação entre esses dois fatores quanto a danos cognitivos, bem como verificar a intervenção com o ambiente enriquecido como uma ferramenta de intervenção positiva nesse quadro.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Verificar os efeitos do enriquecimento ambiental em animais submetidos à desnutrição precoce e de dois diferentes paradigmas de crises convulsivas, quanto à memória espacial de ratos adultos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar os efeitos da desnutrição precoce, das crises convulsivas precoces e do status epilético no peso corporal de ratos imaturos.
- Verificar os efeitos da desnutrição precoce, das crises convulsivas precoces, do status epilético e do enriquecimento ambiental no peso corporal de ratos adultos.
- Verificar os efeitos da desnutrição precoce, das crises convulsivas precoces, do status epilético e do enriquecimento ambiental no peso cerebral de ratos adultos.
- Verificar os efeitos da desnutrição precoce, das crises convulsivas precoces, do status epilético e do enriquecimento ambiental na relação do peso cerebral/peso corporal de ratos adultos.
- Verificar os efeitos da desnutrição precoce no limiar para início de crise nas crises precoces e no status epilético.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ao todo no experimento 12 ratas fêmeas Wistar prenhas e suas ninhadas (restritas a 10 animais) totalizando, inicialmente, 130 ratos. Ao longo de todo experimento 4 animais foram a óbito, sendo o número final de animais estudados igual a 126. Foram selecionados somente os filhotes machos para o trabalho. Os animais foram mantidos durante o período experimental no Instituto de Pesquisa Biomédica da PUCRS, alojados em sistema de caixa moradia climatizada, e mantidos em sistema de 12 horas claro/escuro. As ratas prenhas foram obtidas do biotério do departamento de bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e cuidadosamente transportadas para o Instituto de Pesquisa Biomédica da PUCRS antes de darem a luz, onde ficaram mantidas com água e ração *ad libitum*.

A fase experimental foi dividida em duas. A primeira fase foi composta de 62 animais, divididos em 6 grupos denominados da seguinte maneira: NC: Nutridos Controles (n=11), NCR: Nutridos Crises Precoces (n=09), NSE: Nutridos Status Epilético (n=10), DC: Desnutridos Controles (n=11), DCR: Desnutridos Crises Precoces (n=09) e DSE: Desnutridos Status Epilético (n=12).

Entre o segundo dia pós-natal (P2) e P15, 32 filhotes foram submetidos ao Paradigma de desnutrição (Grupos DC, DCP e DSE) enquanto os outros 30 filhotes foram mantidos com a nutriz (Grupos NC, NCP e NSE). Em P8, P9 e P10, 09 animais nutridos e 09 animais desnutridos foram alocados para o modelo de crises convulsivas precoces (Grupos NCP e DCP). Em P16, 10 animais nutridos e 12 desnutridos foram submetidos a status epilético (Grupos NSE e DSE). Os restantes 22 filhotes da primeira fase experimental constituíram os grupos controle, sem crises, nutridos e desnutridos respectivamente (Grupos NC e DC). Esses animais foram mantidos durante todo o experimento em moradias regulares. A fase de estudo comportamental iniciou após P60, quando os animais se encontravam no período adulto, e prosseguiu até P90, quando todos os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca e retirada dos encéfalos.

A segunda fase constituiu a fase de tratamento com ambiente enriquecido, onde foi repetido inicialmente o mesmo tratamento aos seguintes 64 animais, conforme previamente

descrito. Todos os grupos nessa fase, entretanto, foram alocados em moradias especiais entre P30 e P60, contendo objetos estimulatórios disponíveis para exploração continuamente. Os testes comportamentais iniciaram igualmente em P60 e prosseguiram até P90, quando foi realizado o sacrifício dos animais com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (0,1ml/100g de peso corporal) seguido da perfusão transcardíaca com soro fisiológico e paraformoldeído 4% e retirada dos encéfalos da calota craniana. Os encéfalos foram seccionados ao nível do bulbo, e superiormente foi realizada secção dos nervos ópticos, poupando-se o quiasma óptico e o bulbo olfatório. Todos os encéfalos foram pesados imediatamente após a retirada da calota craniana, em P90.

A nomenclatura dos grupos na segunda fase seguiu o modelo da primeira, acrescido do complemento “COM EA”, respectivamente: NC COM EA (n=15), NCP COM EA (n=08), NSE COM EA (n=13), DC COM EA (n=09), DCP COM EA (n=10) e DSE COM EA (n=09).

4.2 PARADIGMA DE DESNUTRIÇÃO

O regime de desnutrição utilizado foi o de limitação progressiva ao acesso de leite por separação da fêmea nutriz e filhotes. O primeiro dia de vida foi chamado de P0. O afastamento iniciou em P2, com duas horas de duração, e foi progressivamente aumentado em 2 horas por dia até o máximo de 12 horas/dia. O período de desnutrição foi mantido até P15. Em P16 os filhotes foram novamente colocados com a fêmea nutriz, encerrando o período de desnutrição. Todos os animais foram pesados diariamente. Durante o período de separação os filhotes foram mantidos juntos e em gaiola aquecida. Os animais controle permaneceram sempre com a fêmea nutriz com livre acesso à lactação. Todos os filhotes foram separados da fêmea nutriz em P21, quando termina o período de lactação normal desses roedores.

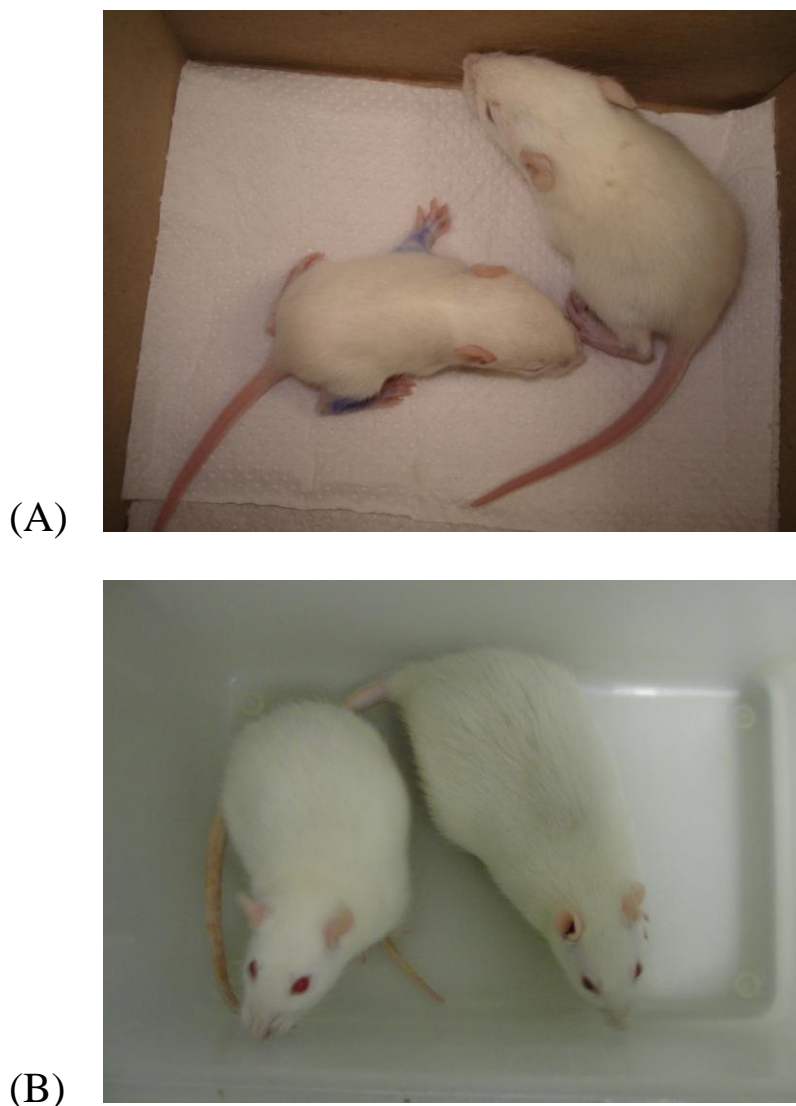


Figura 3 Comparação entre ratos Wistar desnutridos e nutridos.

(A) Ratos Wistar, desnutrido (à esquerda) e nutrido (à direita) em P15. **(B)** Ratos Wistar, desnutrido (à esquerda) e nutrido (à direita) em P90.

4.3 MODELO DE CRISES CONVULSIVAS

O flurothyl [bis-(2,2,2-trifluorethyl)éter] é um agente volátil que estimula rapidamente o sistema nervoso central induzindo crises convulsivas generalizadas. O flurothyl foi utilizado em câmara vedada posicionada dentro da capela do laboratório de Neurociências do IPB- PUCRS. Utilizamos uma bomba de infusão para controle do gotejamento do fármaco.

O modelo de Crises Precoces (CP) consiste no gotejamento de 4-6 gts/min de flurothyl até a ocorrência da primeira crise convulsiva. O horário da primeira crise do animal

foi registrado e o gotejamento foi cessado. Foram induzidas 3 crises por dia, com intervalo de 1 hora entre as mesmas. Tal processo foi repetido durante três dias consecutivos, P8, P9 e P10. Esta faixa corresponde ao período neonatal de seres humanos até os 9 meses de idade.

O modelo de estado de Status Epiléptico (SE) consiste na exposição dos animais ao flurothyl 4-6 gotas por minuto durante 20 minutos, permanecendo mais 10 minutos na câmara fechada. O grupo submetido a SE sofreu crise em P16, faixa correspondente a 3 a 4 anos de idade dos seres humanos.

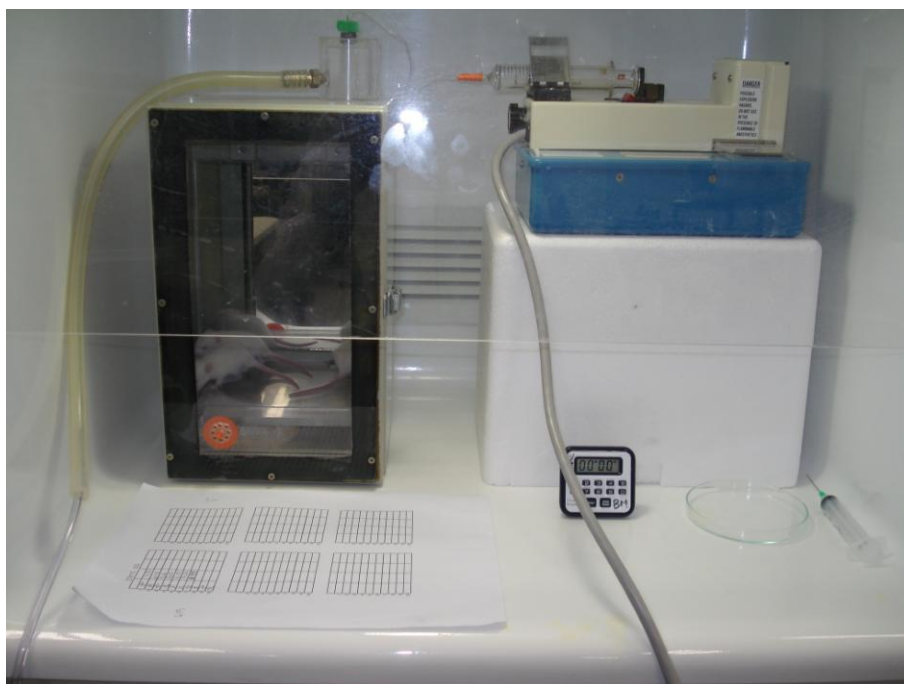


Figura 4 Aparato utilizado para indução de crises convulsivas na capela do laboratório de Neurociências do IPB- PCRS

4.4 MODELO DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Na segunda fase do estudo, entre P30 e P60, 64 animais divididos em 6 grupos igualmente a primeira fase do experimento (nutridos: NC, NCP e NSE, e desnutridos: DC, DCP e DSE) foram alojados em moradias ambientalmente enriquecidas. As caixas utilizadas nessa fase possuíam dimensões de 70 cm largura x 50 cm profundidade x 50 cm de altura e dois andares comunicados por uma rampa. Em seu interior foram distribuídos objetos variados como bolas, canos, aros, *running wheels*, cubos e caixas, de diferentes cores, tamanhos e materiais. Alguns objetos além de proporcionaram estímulos visuais e táteis

serviam de abrigo para os ratos ou como esconderijos onde era colocada a ração, estimulando a exploração. Os objetos foram trocados uma vez por semana, tomando-se o cuidado de não repetir os mesmos objetos em semanas consecutivas. Foram alocados de 10 a 15 animais por caixa de modo a também proporcionar maior interação social entre os animais.

As caixas foram mantidas em ambiente climatizado e os animais tinham livre acesso à água e ração, permanecendo em regime claro-escuro 12/12h.





Figura 5 Aparato utilizado como Enriquecimento Ambiental no biotério do IPB- PUCRS.

4.5 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS – LAM

O Labirinto Aquático de Morris (LAM) foi desenvolvido na década de 1980, por Richard G. Morris como um modelo para investigar a memória em roedores (Morris, 1984) e é hoje o modelo comportamental mais utilizado para estudo do funcionamento da memória hipocampo-dependente. O LAM é um instrumento utilizado na investigação do aprendizado espacial e na avaliação de memória viso-espacial, sendo o paralelo mais próximo da memória episódica de humanos (Jeltsch, Bertrand *et al.*, 2001). Os testes no LAM foram aplicados com objetivo de avaliar a aquisição e retenção da memória viso-espacial, este último através do chamado teste de prova (*probe test*). A aquisição consiste na avaliação do comportamento do animal durante os dias de treino, enquanto o teste de prova é uma medida da persistência do aprendizado espacial.

O labirinto utilizado no experimento encontra-se no Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Trata-se de uma piscina circular de concreto medindo 2 m de diâmetro e 0,6 m de altura, contendo água até uma altura de 25 cm, com as paredes internas pintadas de preto. A água da piscina é mantida entre 21–23°C durante todo o experimento. Há uma plataforma de 12 cm de diâmetro na profundidade de dois centímetros

da superfície. A plataforma é igualmente preta e feita de material abrasivo de maneira que não pode ser vista pelo animal mas o mesmo pode, facilmente, subir nela quando a encontrar. A plataforma é o único local no labirinto onde os animais podem ficar parados, sem precisar nadar. São designados quatro pontos na borda da piscina, o norte (N), o sul (S), o leste (E) e o oeste (O), que dividem a mesma em quatro quadrantes (NO, NE, SE, SO). As paredes ao redor do LAM encontram-se repletas de figuras geométricas contrastantes, facilmente visualizáveis pelos animais, porém comportalmente neutras, e que funcionam como pistas localizatórias para que os animais localizem a plataforma de escape.

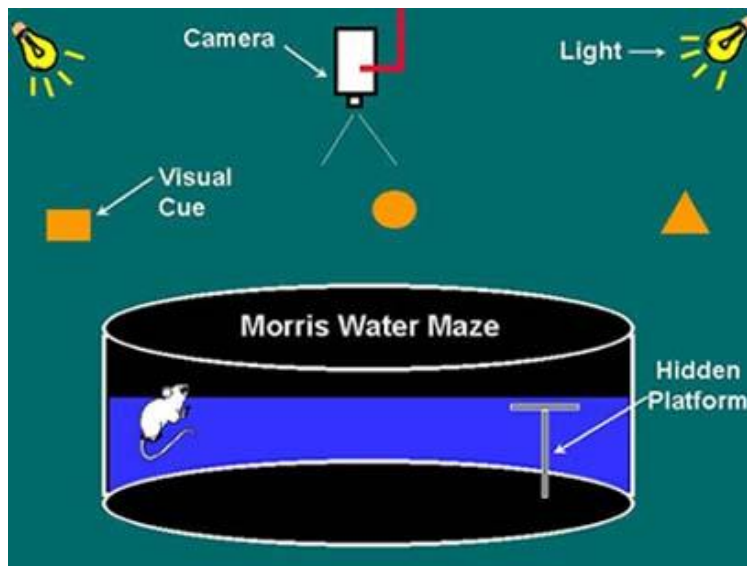


Figura 6 Esquema representativo do LAM

Fonte disponível em <www.mcg.edu/Core/Labs/sabc/Morriswatermaze.htm>

4.5.1 Aprendizado espacial no LAM

O treino na versão espacial do LAM consistiu de uma sessão diária de quatro largadas durante cinco dias consecutivos. A plataforma de escape foi mantida na mesma posição durante os cinco dias de treino. Cada uma das quatro largadas diárias foi iniciada de uma posição distinta da piscina de acordo com um padrão pseudo-aleatório gerado por um sistema computadorizado desenvolvido no Centro de Memória do IPB- PUCRS. A duração máxima de cada largada foi de 60 segundos, se o animal não encontrasse a plataforma neste período de tempo era conduzido até a mesma pelo experimentador. Uma vez na plataforma, o

animal permanecia durante 30 segundos, podendo observar as pistas alocadas ao redor do labirinto. A retenção da memória no LAM foi avaliada no teste de prova. O teste de prova foi realizado 24 horas após o término da sessão de treino, sendo retirada a plataforma de escape e avaliada a trajetória do animal no labirinto durante 60 segundos. O tempo que o animal permaneceu nadando no quadrante alvo (QA, quadrante onde a plataforma de escape estava localizada durante o treino) foi utilizado como indicador de retenção da memória espacial.

As sessões de treino iniciaram em P61, com duração de cinco dias consecutivos, até P65. O teste de prova foi realizado em P66. Os animais da primeira fase do estudo (i.e. SEM EA) estavam até P60 acomodados em moradias regulares conforme previamente descrito, enquanto os animais da segunda fase (i.e. COM EA) permaneceram em moradias enriquecidas ambientalmente até essa mesma data.

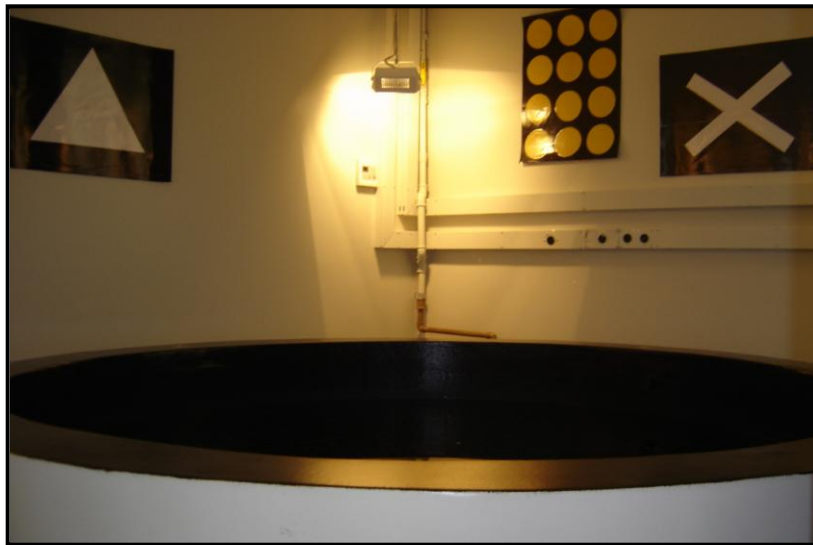


Figura 7 Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do IPB - PUCRS.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão (EP).

Dados referentes ao ganho de peso, peso cerebral e relação peso cerebral/peso corporal foram analisados através do modelo de ANOVA com duplo critério de classificação.

Dados referentes ao limiar para SE foram analisados pelo modelo ANOVA com único critério de classificação. Os dados referentes aos limiares para início das crises no modelo de CP foram analisados pelo modelo ANOVA de medidas repetidas. Os valores basais foram comparados com teste t de Student.

Dados referentes ao treino e testes no LAM foram analisados através do método de ANOVA com triplo critério de classificação.

A significância estatística foi definida como $p < 0,05$ para todos os testes.

As análises estatísticas foram realizadas através de programa estatístico SPSS versão 15.0.

4.7 CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado nos resultados do LAM após um projeto piloto. Considerando um valor de $p < 0,05$ e com um poder de 90% para estimar uma diferença de 40% entre as médias dos grupos, calculou-se um número amostral de aproximadamente 10 animais por grupo.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

No presente estudo os protocolos experimentais utilizados seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório. Os animais receberam cuidados e manuseio adequados e foram submetidos ao mínimo possível de desconforto e estresse. Durante os procedimentos invasivos foram instituídas sedação e analgesia de acordo com a prática de rotina do laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUC-RS.

O estudo foi aprovado pelo Comitê Científico de Ética em Pesquisa da PUC-RS, protocolo número 08/00023, em 19 de agosto de 2008.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DO PESO CORPORAL

5.1.1 Efeito do estado nutricional e das crises convulsivas no peso corporal em P15

A tabela 1 e a figura 8 mostram que a média de ganho de peso corporal entre P2 e P15 foi menor nos animais desnutridos (grupos DC, DCP e DSE; $10,7 \pm 0,4g$) do que nos nutridos (grupos NC, NCP e NSE; $18,5 \pm 0,4g$; $p<0,001$). Quanto à média de ganho de peso corporal em relação a crises, não houve diferença entre os animais submetidos às crises convulsivas precoces em P8, P9 e P10 (grupos DCP e NCP; $14,9 \pm 0,5g$), ao status epilético em P15 (grupos DSE e NSE; $14,8 \pm 0,5 g$) e os animais controles (grupos DC e NC; $14,1 \pm 0,5g$; $p=0,49$). A análise realizada por ANOVA de duas vias indica uma interação entre o estado nutricional e crises convulsivas no peso corporal em P15 ($p<0,001$).

Tabela 1 Ganho de peso corporal até P15.

Comparação do ganho de peso corporal (g) observado entre o P2 e P15 segundo o tipo de crise convulsiva e o estado nutricional em ratos Wistar

Crise	Total			Nutridos			Desnutridos		
	n	Ganho de peso	dif.	n	ganho de peso	dif	n	ganho de peso	dif
Controle	46	$14,1 \pm 0,5$	–	26	$19,2 \pm 0,7$	–	20	$9,1 \pm 0,8$	–
CP	36	$14,9 \pm 0,5$	0,8	17	$16,8 \pm 0,8$	-2,4	19	$13,0 \pm 0,8$	3,9
SE	44	$14,8 \pm 0,5$	0,7	23	$19,5 \pm 0,7$	0,3	21	$10,2 \pm 0,7$	1,1
Total	126	$14,6 \pm 0,3$		66	$18,5 \pm 0,4$		60	$10,7 \pm 0,4$	

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. dif: diferença entre o grupo e o controle. Efeito da crise (CP ou SE) no ganho de peso, $p=0,49$; efeito do estado nutricional no ganho de peso, $p<0,001$; interação entre crise e estado nutricional, $p<0,001$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com duplo critério de classificação.

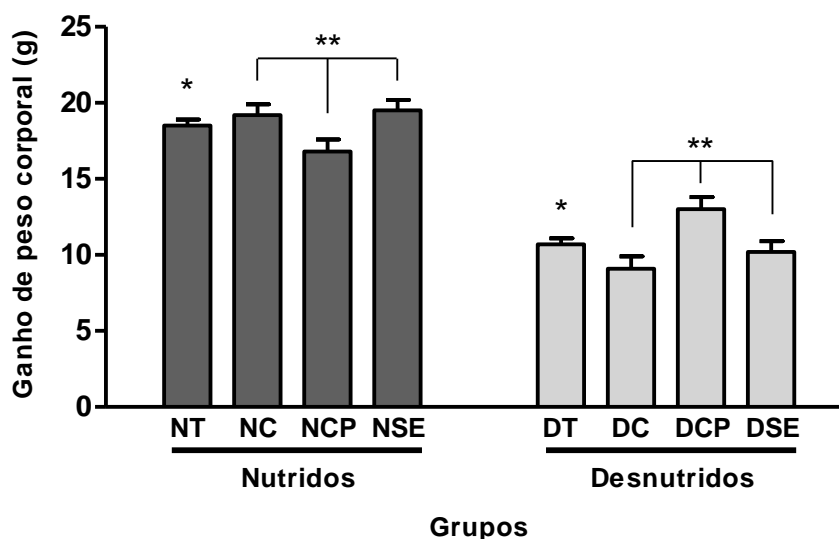


Figura 8 Comparação do ganho de peso corporal em P15. Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos), Nutrido Controle (NC), Nutrido Crise Precoce (NCP), Nutrido Status Epilético (NSE), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos), Desnutrido Controle (DC), Desnutrido Crise Precoce (DCP) e Desnutrido Status Epilético (DSE), entre P2 e P15, em ratos Wistar. Efeito do estado nutricional no ganho de peso corporal (* $P[\text{desnutrição}] < 0,001$). Efeito da interação desnutrição x crises convulsivas (CP ou SE) (** $P[\text{desnutrição} \times \text{crises convulsivas}] < 0,001$).

5.1.2 Efeito do estado nutricional, das crises convulsivas precoces e do enriquecimento ambiental no peso corporal em P90

A tabela 2 e a figura 9 mostram que a média de ganho de peso corporal entre P2 e P90 nos animais SEM EA é significativamente menor nos animais desnutridos (grupos DC e DCP SEM EA; $270,6 \pm 7,3\text{g}$) do que nos nutridos (grupos NC e NCP SEM EA; $295,5 \pm 7,3\text{g}$; $p=0,021$). O mesmo se observa nos animais COM EA entre os desnutridos (grupos DC e DCP COM EA; $277,9 \pm 6,2\text{g}$) comparados aos nutridos (grupos NC e NCP COM EA; $309,4 \pm 6,0\text{g}$; $p < 0,001$). Tanto nos animais SEM EA (grupos DCP e NCP SEM EA; $282,4 \pm 7,7\text{g}$) quanto nos COM EA (grupos DCP e NCP COM EA; $298,3 \pm 6,4\text{g}$), não houve diferença no peso corporal em P90 entre os animais submetidos às crises convulsivas precoces em P8, P9 e P10

e os controles. (SEM EA $p=0,90$; COM EA $p=0,286$). A análise realizada por ANOVA de duas vias indica interação entre estado nutricional e crises convulsivas nos animais SEM EA ($p=0,019$) e COM EA ($p=0,001$). A análise realizada por ANOVA de três vias indica o efeito global do EA como não significativo ($p=0,119$), bem como a interação entre e crises convulsivas e EA ($p=0,432$), interação entre estado nutricional e EA ($p=0,621$), e interação entre crise, estado nutricional e EA ($p=0,746$).

Tabela 2 Ganho de peso corporal até P90 (I)

Comparação do ganho de peso corporal (g) observado entre o P2 e P90 segundo Estado Nutricional e Enriquecimento Ambiental (EA) em ratos Wistar submetidos a Crises Precoces (CP)

Crise	Total			Nutridos			Desnutridos		
	n	ganho de peso	dif	n	ganho de peso	dif	n	ganho de peso	dif
<i>Sem EA</i>									
Controle	22	283,7±6,9	–	11	308,8±9,8	–	11	258,6±9,8	–
CP	18	282,4±7,7	1,3	09	299,2±10,8	-9,6	09	282,6±10,8	24
Total	40	283,1±5,2		20	295,5±7,3		20	270,6±7,3	
<i>Com EA</i>									
Controle	24	289,0±5,7	–	15	319,6±7,0	–	09	258,4±9,0	–
CP	18	298,3±6,4	9,3	08	299,2±9,6	-20,4	10	297,3±8,5	38,9
Total	42	293,6±4,3		23	309,4±6,0		19	277,9±6,2	

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. dif: diferença em relação ao controle. *Sem EA*: efeito da crise no ganho de peso, $p=0,90$; efeito do estado nutricional no ganho de peso, $p=0,021$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,019$. *Com EA*: efeito da crise no ganho de peso, $p=0,286$; efeito do estado nutricional no ganho de peso, $p=0,001$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,001$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com duplo critério de classificação. Análise global do efeito do EA, $p=0,119$; interação entre crise e EA, $p=0,432$; interação entre estado nutricional e EA, $p=0,621$; interação entre crise, estado nutricional e EA, $p=0,746$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com triplo critério de classificação.

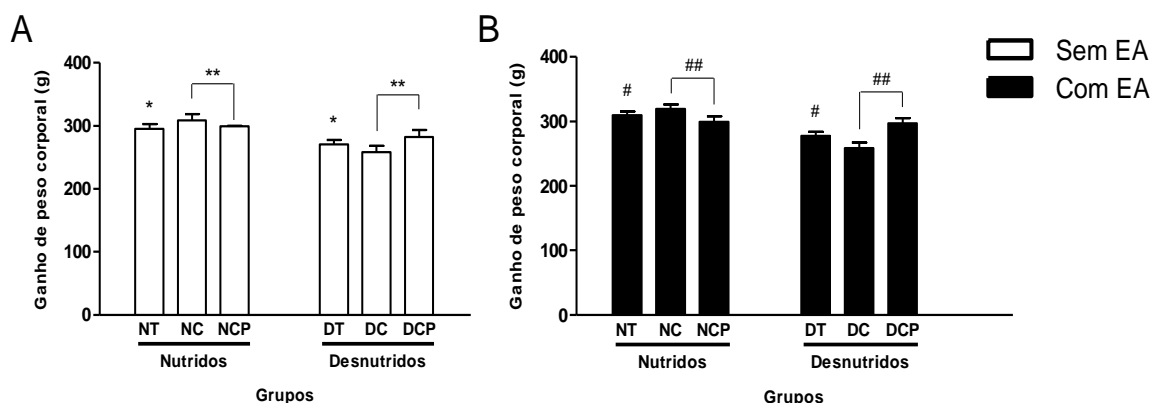


Figura 9 Comparação do ganho de peso corporal em P90 (I).

Nutrindo Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos, NC e NCP), Nutrindo Controle (NC), Nutrindo Crise Precoce (NCP), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos, DC e DCP), Desnutrido Controle (DC), Desnutrido Crise Precoce (DCP), entre P2 e P90, em ratos Wistar, sendo A= SEM Enriquecimento Ambiental (EA) e B= COM EA. (A) Efeito do estado nutricional no ganho de peso corporal (* P [desnutrição]=0,021). Efeito da interação desnutrição x crises convulsivas (** P [desnutrição x crises convulsivas]=0,019). (B) Efeito do estado nutricional no ganho de peso corporal (# P [desnutrição]=0,001). Efeito da interação desnutrição x crises convulsivas (## P [desnutrição x crises convulsivas]=0,001).

5.1.3 Efeito do estado nutricional, do status epilético e do enriquecimento ambiental no peso corporal em P90

A tabela 3 e a figura 10 mostram que a média de ganho de peso corporal entre P2 e P90 nos animais SEM EA é menor nos animais desnutridos (grupos DC e DSE SEM EA; $271,3 \pm 7,7$ g) do que nos nutridos (grupos NC e NSE SEM EA; $295,8 \pm 8,1$ g; $p=0,034$) de maneira significativa. Nos animais COM EA também se observa menor peso nos animais desnutridos (grupos DC e DSE COM EA; $262,4 \pm 6,0$ g) comparado aos nutridos (grupos NC e NSE COM EA; $314,3 \pm 4,8$ g; $p<0,001$). Tanto nos animais SEM EA (grupos DSE e NSE SEM EA; $283,4 \pm 7,9$ g) quanto nos animais COM EA (grupos DSE e NSE COM EA; $287,7 \pm 5,4$ g), não houve diferença no peso corporal em P90 entre os animais submetidos ao SE em

P16 comparados aos controles (SEM EA $p=0,976$; COM EA $p=0,869$). A análise realizada por ANOVA de duas vias indica uma interação entre desnutrição e crises convulsivas nos animais SEM EA ($p=0,027$) e não demonstra uma interação entre esses fatores no grupo COM EA ($p=0,232$). A análise realizada por ANOVA de três vias indica o efeito global do EA como não significativo ($p=0,476$), tampouco quanto à interação entre e crises convulsivas e EA ($p=0,946$) e interação entre crise, estado nutricional e EA ($p=0,226$). A única interação significativa ocorreu entre estado nutricional e EA ($p=0,621$).

Tabela 3 Ganho de peso corporal até P90 (II)

Comparação do ganho de peso corporal (g) observado entre P2 e P90 segundo Estado Nutricional e Enriquecimento Ambiental (EA) em ratos Wistar submetidos a Status Epilético (SE)

Crise	Total			Nutridos			Desnutridos		
	n	ganho de peso	dif	n	ganho de peso	dif	n	ganho de peso	dif
<i>Sem EA</i>									
Controle	22	283,7±7,9	-	11	308,8±11,1	-	11	258,6±11,1	-
SE	22	283,4±7,9	-0,3	10	282,8±11,7	-26,0	12	283,9±10,7	25,3
Total	44	283,6±5,6		21	295,8 ±8,1		23	271,3±7,7	
<i>Com EA</i>									
Controle	24	289,0±5,3	-	15	319,6±6,5	-	9	258,4±8,4	-
SE	22	287,7±5,4	-1,3	13	309,1±7,0	-10,5	9	266,4±8,4	8,0
Total	46	288,4±3,8		28	314,3±4,8		18	262,4±6,0	

Os dados são apresentados como média ± erro padrão. dif: diferença em relação ao controle. *Sem EA*: efeito da crise no ganho de peso, $p=0,976$; efeito do estado nutricional no ganho de peso, $p=0,034$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,027$. *Com EA*: efeito da crise no ganho de peso, $p=0,869$; efeito do estado nutricional no ganho de peso, $p<0,001$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,232$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com duplo critério de classificação. Análise global do efeito do EA, $p=0,476$; interação entre crise e EA, $p=0,946$; interação entre estado nutricional e EA, $p=0,045$; interação entre crise, estado nutricional e EA, $p=0,226$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com triplo critério de classificação.

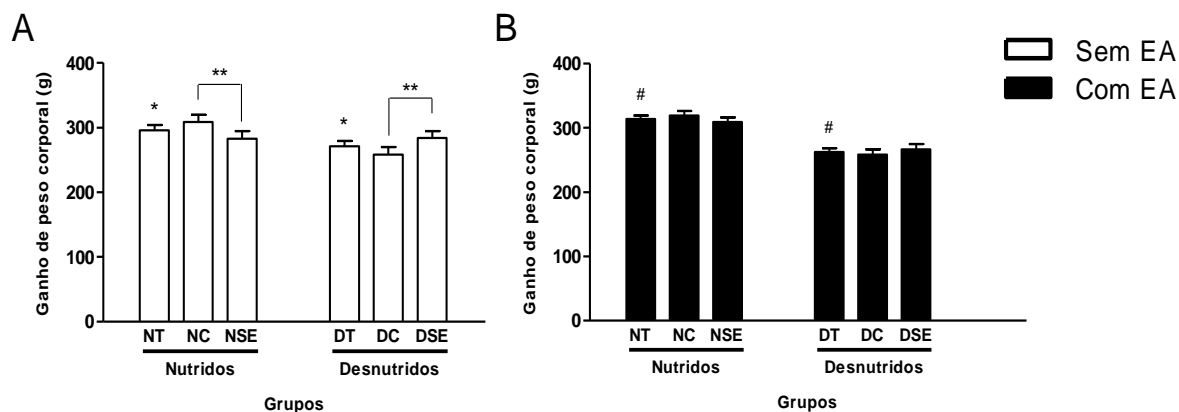


Figura 10 Comparação do ganho de peso corporal em P90 (II).

Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos, NC e NSE), **Nutrido Controle (NC)**, **Nutrido Status Epilético (NSE)**, **Desnutrido Total (DT)** (i.e. todos os animais desnutridos, DC e DSE), **Desnutrido Controle (DC)**, **Desnutridos Status Epilético (NSE)**, entre P2 e P90, em ratos Wistar, sendo A= SEM Enriquecimento Ambiental (EA) e B= COM EA. (A) Efeito do estado nutricional no ganho de peso corporal (* $P[\text{desnutrição}]=0,034$). Efeito da interação desnutrição x crises convulsivas (** $P[\text{desnutrição} \times \text{crises convulsivas}]=0,027$). (B) Efeito do estado nutricional no ganho de peso corporal (# $P[\text{desnutrição}]<0,001$).

A figura 11 (A,B,C,D) representa as curvas de crescimento do ganho de peso corporal de todos os animais, de P2 até P90.

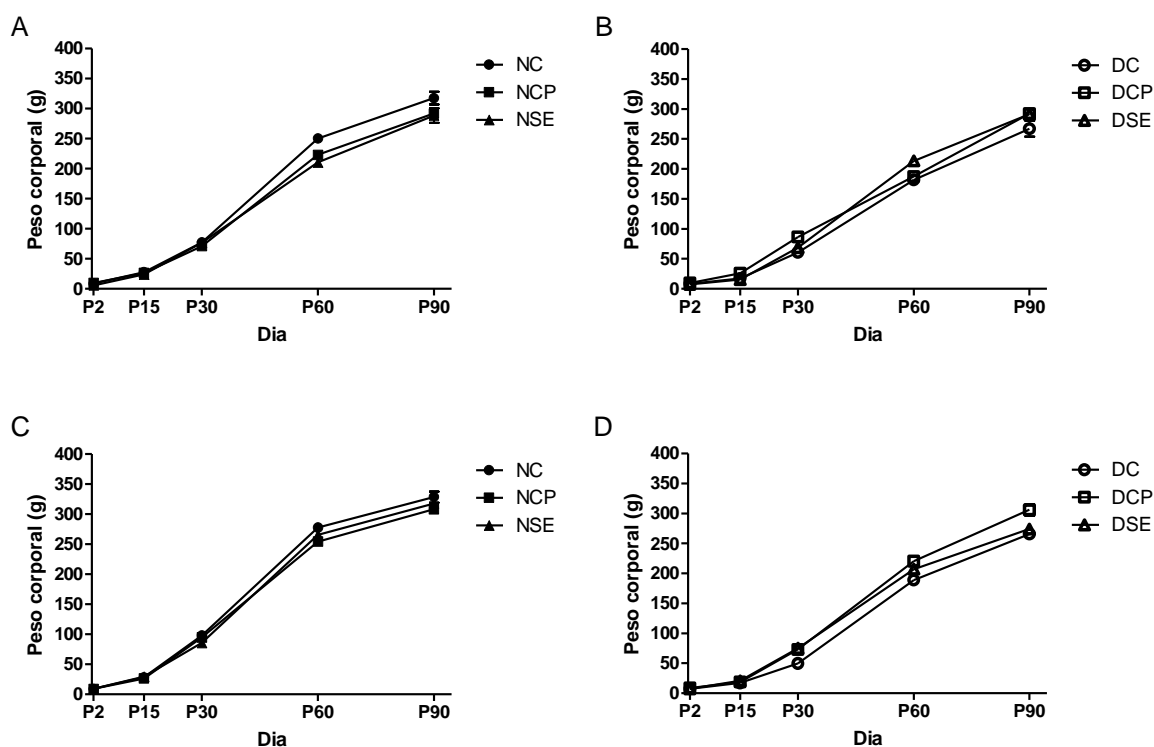


Figura 11 Representação das curvas de ganho de peso corporal.

Nutrido Controle (NC), Nutrido Crise Precoce (NCP), Nutrido Status Epilético (NSE), Desnutrido Controle (DC), Desnutrido Crise Precoce (DCP) e Desnutrido Status Epilético (DSE), entre P2 e P90, em ratos Wistar, SEM EA (gráficos A e B) e COM EA (gráficos C e D). (A) Nutridos SEM EA (B) Desnutridos SEM EA (C) Nutridos COM EA (D) Desnutridos COM EA.

5.2 ANÁLISE DO PESO CEREBRAL

5.2.1 Efeito do estado nutricional, das crises convulsivas precoces e do enriquecimento ambiental no peso cerebral em P90

A tabela 4 e a figura 12 mostram que a média do peso cerebral em P90 nos animais SEM EA não apresentou diferença entre nos animais desnutridos (grupos DC e DCP SEM EA; $1,79 \pm 0,03\text{g}$) e os nutridos (grupos NC e NCP SEM EA; $1,85 \pm 0,03\text{g}$; $p=0,129$). Nos animais COM EA se observa o peso cerebral em P90 significativamente menor nos animais

desnutridos (grupos DC e DCP COM EA; $1,85 \pm 0,02g$) comparado aos nutridos (grupos NC e NCP COM EA; $1,97 \pm 0,02g$; $p=0,001$). Nos animais SEM EA (grupos DCP e NCP SEM EA; $1,83 \pm 0,03g$) não houve diferença no peso cerebral em P90 entre os animais submetidos às crises convulsivas precoces em P8, P9 e P10 e controles ($p=0,366$). Todavia, os animais COM EA (grupos DCP e NCP COM EA; $1,95 \pm 0,02g$), apresentaram diferença no peso cerebral em P90 quando submetidos às crises precoces (COM EA $p=0,022$). A análise realizada por ANOVA de duas vias não indica interação entre desnutrição e crises convulsivas nos animais SEM EA ($p=0,352$), mas um valor limítrofe é observado no grupo COM EA ($p=0,066$). A análise realizada por ANOVA de três vias indica o efeito global do EA significativo quanto ao peso cerebral ($p<0,001$). Não se verifica, entretanto, interação entre e crises convulsivas e EA ($p=0,40$), entre estado nutricional e EA ($p=0,238$) ou entre crise, estado nutricional e EA ($p=0,619$).

Tabela 4 Peso cerebral em P90 (I).

Comparação do peso cerebral (g) observado em P90 segundo Estado Nutricional e Enriquecimento Ambiental (EA) em ratos Wistar submetidos a Crises Precoces (CP)

Crise	Total			Nutridos			Desnutridos		
	n	peso cerebral	dif	n	peso cerebral	dif	n	peso cerebral	dif
<i>Sem EA</i>									
Controle	22	$1,80 \pm 0,02$	–	11	$1,85 \pm 0,03$	–	11	$1,75 \pm 0,03$	–
CP	18	$1,83 \pm 0,03$	0,03	9	$1,84 \pm 0,04$	-0,01	9	$1,80 \pm 0,04$	0,05
Total	40	$1,82 \pm 0,02$		20	$1,85 \pm 0,03$		20	$1,79 \pm 0,03$	
<i>Com EA</i>									
Controle	24	$1,87 \pm 0,02$	–	15	$1,96 \pm 0,02$	–	9	$1,79 \pm 0,03$	–
CP	18	$1,95 \pm 0,02$	0,08	8	$1,97 \pm 0,03$	0,01	10	$1,92 \pm 0,03$	0,13
Total	42	$1,91 \pm 0,01$		23	$1,97 \pm 0,02$		19	$1,85 \pm 0,02$	

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. dif: diferença em relação ao controle. *Sem EA*: efeito da crise no peso cerebral, $p=0,366$; efeito do estado nutricional no peso cerebral, $p=0,129$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,352$. *Com EA*: efeito da crise no peso cerebral, $p=0,022$; efeito do estado nutricional no peso cerebral, $p=0,001$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,066$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com duplo critério de classificação. Análise global do efeito do EA, $p<0,001$; interação entre crise e EA, $p=0,40$; interação entre estado nutricional e EA, $p=0,238$; interação entre crise, estado nutricional e EA, $p=0,619$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com triplo critério de classificação.

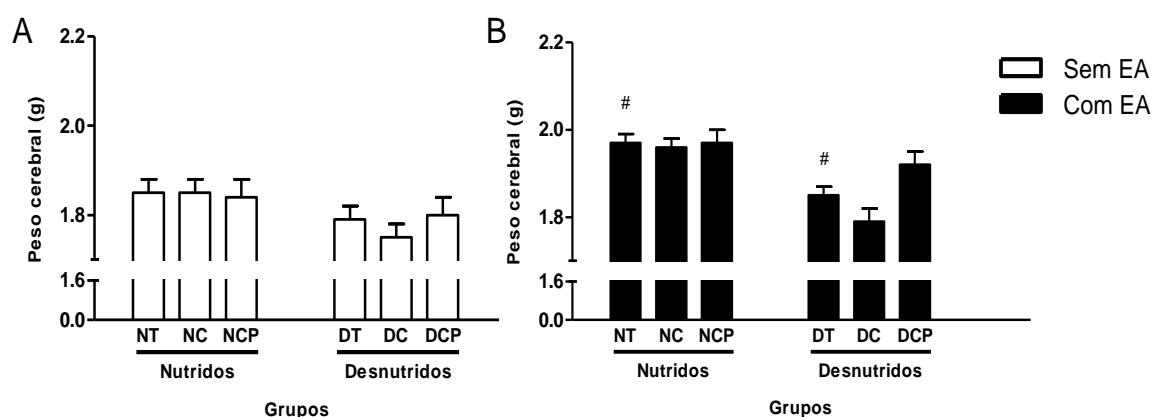


Figura 12 Comparação do peso cerebral em P90 (I).

Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos, NC e NCP), **Nutrido Controle (NC)**, **Nutrido Crise Precoce (NCP)**, **Desnutrido Total (DT)** (i.e. todos os animais desnutridos, DC e DCP), **Desnutrido Controle (DC)**, **Desnutrido Crise Precoce (DCP)**, em ratos Wistar, sendo A= SEM Enriquecimento Ambiental (EA) e B= COM EA. (A) Valores encontrados não significativos. (B) Efeito do estado nutricional no peso cerebral (# $P[\text{desnutrição}]=0,001$). Efeito das crises convulsivas precoces no peso cerebral ($P[\text{crise}]=0,022$). Efeito do EA no peso cerebral ($P[\text{EA}]<0,001$).

5.2.2 Efeito do estado nutricional, do status epilético e do enriquecimento ambiental no peso cerebral em P90

A tabela 5 e a figura 13 mostram que a média do peso cerebral em P90 nos animais SEM EA não apresentou diferença entre nos animais desnutridos (grupos DC e DSE SEM EA; $1,77 \pm 0,03\text{g}$) e os nutridos (grupos NC e NSE SEM EA; $1,75 \pm 0,03\text{ g}$; $p=0,46$). Nos animais COM EA se observa o peso cerebral em P90 significativamente menor nos animais desnutridos (grupos DC e DSE COM EA; $1,75 \pm 0,02\text{g}$) comparado aos nutridos (grupos NC e NSE COM EA; $1,96 \pm 0,02\text{g}$; $p<0,001$). Nos animais SEM EA (grupos DSE e NSE SEM EA; $1,72 \pm 0,03\text{g}$) há um valor limítrofe à diferença no peso cerebral em P90 entre os animais submetidos ao SE em P16, comparados aos controles. (SEM EA $p=0,045$) Entretanto, nos animais COM EA (grupos DSE e NSE COM EA; $1,83 \pm 0,02\text{g}$), não se verificou diferença no

peso cerebral em P90 quando submetidos ao SE (COM EA $p=0,096$). A análise realizada por ANOVA de duas vias indica interação entre desnutrição e crises convulsivas nos animais SEM EA ($p=0,005$), mas não no grupo COM EA ($p=0,145$). A análise realizada por ANOVA de três vias indica o efeito global do EA significativo quanto ao peso cerebral ($p<0,001$), quanto à interação entre estado nutricional e EA ($p<0,001$) e a interação entre crise, estado nutricional e EA ($p<0,001$). Não se verifica, porém, interação entre e crises convulsivas e EA ($p=0,458$).

Tabela 5 Peso cerebral em P90 (II).

Comparação do peso cerebral (g) observado em P90 segundo Estado Nutricional e Enriquecimento Ambiental (EA) em ratos Wistar submetidos a Status Epilético (SE)

Crise	Total			Nutridos			Desnutridos		
	n	peso cerebral	dif	n	peso cerebral	dif	n	peso cerebral	dif
<i>Sem EA</i>									
Controle	22	1,80±0,03	–	11	1,85±0,04	–	11	1,75±0,04	–
SE	22	1,72±0,03	-0,08	10	1,64±0,04	-0,21	12	1,79±0,04	0,04
Total	44	1,76±0,02		21	1,75±0,03		23	1,77±0,03	
<i>Com EA</i>									
Controle	24	1,87±0,02	–	15	1,96±0,02	–	9	1,79±0,03	–
SE	22	1,83±0,02	-0,04	13	1,95±0,03	-0,01	9	1,70±0,03	-0,09
Total	46	1,85±0,01		28	1,96±0,02		18	1,75±0,02	

Os dados são apresentados como média ± erro padrão. dif: diferença em relação ao controle. *Sem EA*: efeito da crise no peso cerebral, $p=0,045$; efeito do estado nutricional no peso cerebral, $p=0,46$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,005$. *Com EA*: efeito da crise no peso cerebral, $p=0,096$; efeito do estado nutricional no peso cerebral, $p<0,001$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,145$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com duplo critério de classificação. Análise global do efeito do EA, $p<0,001$; interação entre crise e EA, $p=0,458$; interação entre estado nutricional e EA, $p<0,001$; interação entre crise, estado nutricional e EA, $p<0,001$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com triplo critério de classificação.

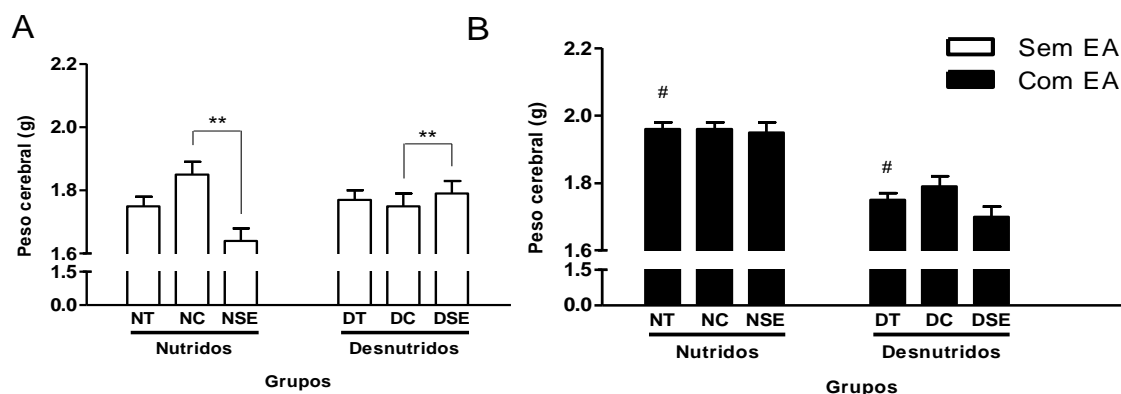


Figura 13 Comparação do peso cerebral em P90 (II).

Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos, NC e NSE), **Nutrido Controle (NC)**, **Nutrido Status Epilético (NSE)**, **Desnutrido Total (DT)** (i.e. todos os animais desnutridos, DC e DSE), **Desnutrido Controle (DC)**, **Desnutridos Status Epilético (NSE)**, em ratos Wistar, sendo A= SEM Enriquecimento Ambiental (EA) e B= COM EA. (A) Efeito da crise no peso cerebral (**P[crise]=0,045). Efeito da interação desnutrição x crises convulsivas no peso cerebral (**P[desnutrição x crises convulsivas]=0,005). (B) Efeito do estado nutricional no peso cerebral (#P[desnutrição]<0,001). Efeito do EA peso cerebral ([EA]<0,001).

5.3 ANÁLISE DA RELAÇÃO PESO CEREBRAL/PESO CORPORAL

5.3.1 Efeito do estado nutricional, das crises convulsivas precoces e do enriquecimento ambiental na relação peso cerebral/peso corporal em P90

A tabela 6 e a figura 14 mostram que a média do peso cerebral/peso corporal em P90 nos animais SEM EA apresentou valor limítrofe para a significância estatística entre os animais desnutridos (grupos DC e DCP SEM EA; $0,65 \pm 0,01$) e os nutridos (grupos NC e NCP SEM EA; $0,61 \pm 0,01$, $p=0,09$). Nos animais COM EA há diferença significativa da relação peso cerebral/peso corporal em P90, sendo maior nos animais desnutridos (grupos DC e DCP COM EA; $0,65 \pm 0,01$) comparando-se aos nutridos (grupos NC e NCP COM EA;

0,62 ± 0,01; p=0,044). Tanto nos animais SEM EA (grupos DCP e NCP SEM EA; 0,63 ± 0,01) quanto nos COM EA (grupos DCP e NCP COM EA; 0,63 ± 0,01), não houve diferença na relação peso cerebral/peso corporal em P90 entre os animais submetidos às crises convulsivas precoces em P8, P9 e P10 comparados aos controles (SEM EA p=0,927; COM EA p=0,858). A análise realizada por ANOVA de duas vias indica interação entre desnutrição e crises convulsivas nos animais SEM EA (p=0,035), bem como nos animais COM EA (p=0,006). A análise realizada por ANOVA de três vias indica o efeito global do EA como não significativo quanto a relação peso cerebral/peso corporal (p=0,522), quanto à interação entre e crises convulsivas e EA (p=0,859), quanto à interação entre estado nutricional e EA (p=0,805) e à interação entre crise, estado nutricional e EA (p=0,881).

Tabela 6 Relação peso cerebral/peso corporal em P90 (I).

Comparação da relação peso cerebral/peso corporal (Pcer/Pcorp) observada em P90 segundo Estado Nutricional e Enriquecimento Ambiental (EA) em ratos Wistar submetidos a Crises Precoces (CP)

Crise	Total			Nutridos			Desnutridos		
	n	Pcer/Pcorp	dif	n	Pcer/Pcorp	dif	n	Pcer/Pcorp	dif
<i>Sem EA</i>									
Controle	22	0,63±0,01	–	11	0,59±0,02	–	11	0,67±0,02	–
CP	18	0,63±0,01	–	9	0,63±0,02	0,04	9	0,62±0,02	-0,05
Total	40	0,63±0,01		20	0,61±0,01		20	0,65±0,01	
<i>Com EA</i>									
Controle	24	0,64±0,01	–	15	0,60±0,01	–	9	0,67±0,01	–
CP	18	0,63±0,01	-0,01	8	0,64±0,02	0,04	10	0,63±0,01	-0,04
Total	42	0,64±0,01		23	0,62±0,01		19	0,65±0,01	

Os dados são apresentados como média ± erro padrão. dif: diferença em relação ao controle. *Sem EA*: efeito da crise na relação peso cerebral/peso corporal, p=0,927; efeito do estado nutricional na relação peso cerebral/peso corporal, p=0,09; interação entre crise e estado nutricional, p=0,035. *Com EA*: efeito da crise na relação peso cerebral/peso corporal, p=0,858; efeito do estado nutricional na relação peso cerebral/peso corporal, p=0,044; interação entre crise e estado nutricional, p=0,006. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com duplo critério de classificação. Análise global do efeito do EA, p=0,522; interação entre crise e EA, p=0,859; interação entre estado nutricional e EA, p=0,805; interação entre crise, estado nutricional e EA, p=0,881. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com triplo critério de classificação.

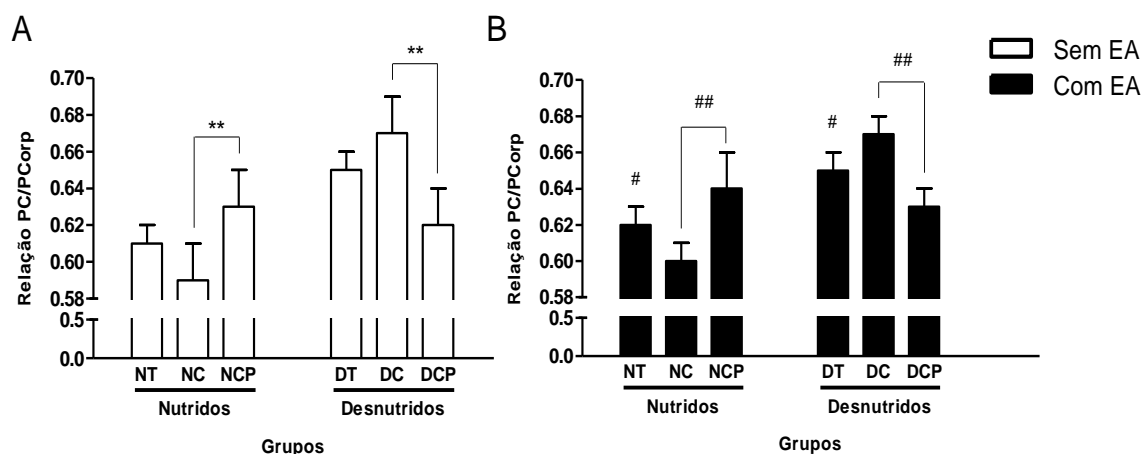


Figura 14 Comparação da relação peso cerebral/peso corporal em P90 (I).

Nutrído Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos, NC e NCP), Nutrído Controle (NC), Nutrído Crise Precoce (NCP), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos, DC e DCP), Desnutrido Controle (DC), Desnutrido Crise Precoce (DCP), em ratos Wistar, sendo (A) SEM Enriquecimento Ambiental (EA) e (B) COM EA. (A) Efeito da interação desnutrição x crises convulsivas na relação peso cerebral/ peso corporal (** $P[\text{desnutrição} \times \text{crises convulsivas}] = 0,035$). (B) Efeito do estado nutricional na relação peso cerebral/peso corporal (# $P[\text{desnutrição}] = 0,044$). Efeito da interação desnutrição x crises convulsivas (## $P[\text{desnutrição} \times \text{crises convulsivas}] = 0,006$).

5.3.2 Efeito do estado nutricional, do status epilético e do enriquecimento ambiental na relação peso cerebral/peso corporal em P90

A tabela 7 e a figura 15 mostram que a média do peso cerebral/peso corporal em P90 nos animais SEM EA apresentou diferença entre nos animais desnutridos (grupos DC e DSE SEM EA; $0,64 \pm 0,02$) e os nutridos (grupos NC e NSE SEM EA; $0,58 \pm 0,02$; $p = 0,018$), sendo esta maior nos desnutridos. Da mesma forma, nos animais COM EA a relação peso cerebral/peso corporal em P90 foi maior nos animais desnutridos (grupos DC e DSE COM EA; $0,65 \pm 0,01$) comparando-se aos nutridos (grupos NC e NSE COM EA; $0,61 \pm 0,01$; $p = 0,01$). Tanto nos animais SEM EA (grupos DSE e NSE SEM EA; $0,60 \pm 0,02$) quanto nos

COM EA (grupos DSE e NSE COM EA; $0,62 \pm 0,01$), não houve diferença na relação peso cerebral/peso corporal em P90 entre os animais submetidos ao SE P16 comparados aos controles (SEM EA $p=0,264$; COM EA $p=0,189$). A análise realizada por ANOVA de duas vias não mostra interação entre desnutrição e SE nos animais SEM EA ($p=0,443$), mas sim na interação nos animais COM EA ($p=0,027$). A análise realizada por ANOVA de três vias indica o efeito global do EA como não significativo ($p=0,30$), bem como a interação entre e crises e EA ($p=0,746$), interação entre estado nutricional e EA ($p=0,42$), e interação entre crise, estado nutricional e EA ($p=0,644$).

Tabela 7 Relação peso cerebral/peso corporal em P90 (II).

Comparação da relação peso cerebral/peso corporal (Pcer/Pcorp) observada em P90 segundo Estado Nutricional e Enriquecimento Ambiental (EA) em ratos Wistar submetidos a Status Epilético (SE)

Crise	Total			Nutridos			Desnutridos		
	n	Pcer/Pcorp	dif	n	Pcer/Pcorp	dif	n	Pcer/Pcorp	dif
<i>Sem EA</i>									
Controle	22	0,63±0,02	–	11	0,59±0,02	–	11	0,67±0,02	–
SE	22	0,60±0,02	-0,03	10	0,58±0,03	-0,01	12	0,62±0,02	-0,05
Total	44	0,61±0,01		21	0,58±0,02		23	0,64±0,02	
<i>Com EA</i>									
Controle	24	0,64±0,01	–	15	0,60±0,01	–	9	0,67±0,02	–
SE	22	0,62±0,01	-0,02	13	0,62±0,01	0,02	9	0,62±0,02	-0,05
Total	46	0,63±0,01		28	0,61±0,01		18	0,65±0,01	

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. dif: diferença em relação ao controle. *Sem EA*: efeito da crise na relação peso cerebral/peso corporal, $p=0,264$; efeito do estado nutricional na relação peso cerebral/peso corporal, $p=0,018$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,443$. *Com EA*: efeito da crise na relação peso cerebral/peso corporal, $p=0,189$; efeito do estado nutricional na relação peso cerebral/peso corporal, $p=0,01$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,027$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com duplo critério de classificação. Análise global do efeito do EA, $p=0,30$; interação entre crise e EA, $p=0,746$; interação entre estado nutricional e EA, $p=0,42$; interação entre crise, estado nutricional e EA, $p=0,644$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com triplo critério de classificação.

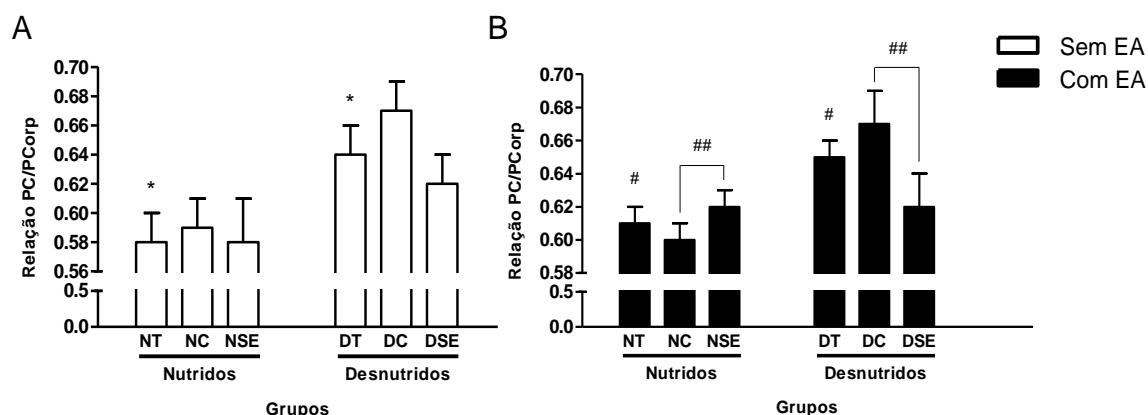


Figura 15 Comparação da relação peso cerebral/peso corporal em P90 (II). Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos, NC e NSE), Nutrido Controle (NC), Nutrido Status Epilético (NSE), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos, DC e DSE), Desnutrido Controle (DC), Desnutridos Status Epilético (NSE), em ratos Wistar, sendo A= SEM Enriquecimento Ambiental (EA) e B= COM EA. (A) Efeito do estado nutricional no ganho de peso corporal (* P [desnutrição]=0,018). (B) Efeito do estado nutricional no ganho de peso corporal (# P [desnutrição]<0,01). Efeito da interação desnutrição x crises convulsivas (## P [desnutrição x crises convulsivas]=0,027).

5.4 ANÁLISE DO LIMIAR PARA CRISES CONVULSIVAS

5.4.1 Efeito do estado nutricional no limiar para crises convulsivas precoces

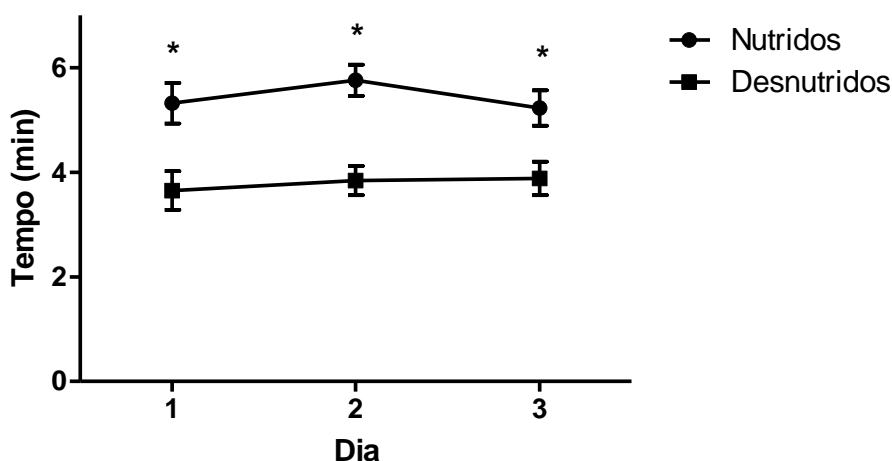
A tabela 8 e a figura 16 mostram a análise realizada através do teste t de *Student* na comparação entre a média dos limiares para início das CP no Dia 1, evidenciando diferença entre nos animais desnutridos (DCP; $3,65 \pm 0,37$ min) e os nutridos (NCP; $5,32 \pm 0,39$ min). O efeito observado do estado nutricional no limiar para crises precoces foi significativo ($p=0,004$). O efeito do tempo, isto é, a comparação entre a média dos limiares para início das crises dos Dias 1, 2 e 3, não apresentou significância estatística ($p=0,251$). Ademais, não foi observada interação entre o tempo e o estado nutricional no limiar para CP ($p=0,365$). Os valores estatísticos foram obtidos pelo modelo ANOVA de modalidades repetidas.

Tabela 8 Limiar para crises precoces em P8, P9 e P10.

Comparação do limiar para CP (min) observado em P8, P9 e P10 segundo o Estado Nutricional em ratos Wistar

CP	Nutridos		Desnutridos	
	n	limiar	n	limiar
Dia 1	17	5,32±0,39	19	3,65±0,37
Dia 2	17	5,76±0,30	19	3,84±0,28
Dia 3	17	5,23±0,34	19	3,88±0,32

Os dados são apresentados como média ± erro padrão. Comparação no Dia 1, $p=0,004$; efeito do tempo no limiar para CP, $p=0,251$; efeito do estado nutricional, $p<0,001$; interação entre tempo e estado nutricional, $p=0,365$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo ANOVA de modalidades repetidas com teste t de *Student* na comparação com o Dia 1 (basal).

**Figura 16 Comparação do limiar convulsivo em P8, P9 e P10.**

Comparação entre os grupos que sofreram crises precoces (grupos NCP e DCP; i.e. Nutrido Crise Precoce e Desnutrido Crise Precoce), em P8 (Dia 1), P9 (Dia 2) e P10 (Dia 3), de acordo com o estado nutricional, em ratos Wistar. Efeito do estado nutricional no limiar para crises precoces (* $P[\text{desnutrição}]<0,001$). Não houve diferença significativa quanto ao tempo no limiar convulsivo ($P=0,251$).

5.4.2 Efeito do estado nutricional no limiar para status epilético

A análise realizada através do teste t de *Student* na comparação entre os limiares para ocorrência de SE não mostrou diferença no tempo para início do SE entre os animais nutridos (grupos NC e NSE; $6,67 \pm 0,30$ min) e desnutridos (grupos DC e DSE; $6,92 \pm 0,32$ min), como visto na tabela 9 e na figura 17. Foi utilizado o modelo de análise estatística ANOVA com único critério de classificação.

Tabela 9 Limiar para status epilético em P16.

Comparação do limiar para SE (min) observado em P16 segundo o Estado Nutricional em ratos Wistar

SE	Nutridos		Desnutridos	
	n	limiar	n	limiar
Tempo para SE, min	23	$6,67 \pm 0,30$	21	$6,92 \pm 0,32$

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Efeito do estado nutricional no SE, $p=0,57$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo ANOVA com único critério de classificação.

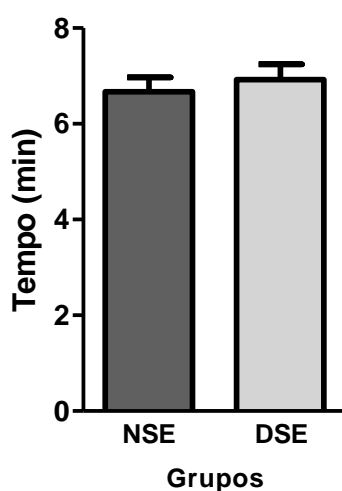


Figura 17 Comparação de limiar convulsivo em P16.

Comparação entre os grupos que sofreram status epilético (grupos NSE e DSE, i.e. Nutrido Status Epilético e Desnutrido Status Epilético), em P16, de acordo com o estado nutricional, em ratos Wistar. Não houve diferença significativa no limiar convulsivo ($P=0,57$).

5.5 ANÁLISE DA AQUISIÇÃO E RETENÇÃO NA MEMÓRIA ESPACIAL

5.5.1 Efeito do estado nutricional, das crises convulsivas e do enriquecimento ambiental na aquisição da memória espacial

A tabela 10 (A) e (B) e a figura 18 (A) e (B) mostram as latências de escape para a plataforma oculta durante os 5 dias de treinamento no LAM. A análise através de ANOVA multifatorial indica que a latência de escape diminuiu em todos os grupos experimentais com o progresso do treino ($p < 0,001$), tanto nos animais SEM EA quanto nos COM EA. Nos animais SEM EA a interação entre o fator tempo (progresso do treino) e crise não foi significativa ($p = 0,323$), e o mesmo ocorreu entre tempo e estado nutricional ($p = 0,217$), e entre tempo, crise e estado nutricional ($p = 0,878$). Nos animais COM EA, a interação entre tempo e estado nutricional foi significativa ($p = 0,01$), enquanto isso não ocorreu entre tempo e crise ($p = 0,494$) ou entre tempo, crise e estado nutricional ($p = 0,458$). Nos animais SEM EA não ocorreu significância estatística no aprendizado durante o treinamento quanto ao estado nutricional ($p = 0,093$). Houve, contudo, diferença significativa quanto à ocorrência de crises precoces de P8 a P10 ou status epilético em P16 no aprendizado comparado aos ratos controles ($p < 0,001$). A interação entre crises e estado nutricional apresentou valor limítrofe para a significância ($p = 0,076$). Nos animais COM EA também não ocorreu diferença significativa no aprendizado quanto ao estado nutricional ($p = 0,171$), mas vê-se significância quanto à ocorrência de CP ou SE ($p = 0,024$) e quanto à interação entre crises e estado nutricional ($p = 0,039$). Os animais COM EA apresentaram melhor desempenho no aprendizado no LAM ($p = 0,001$) quando comparados aos SEM EA. Não houve interação entre estado nutricional e EA (0,782), quanto ao tempo (progresso do treino) e EA ($p = 0,085$), ou quanto à ocorrência de crises EA (0,134), mas sim entre estado nutricional, crises e EA (0,004).

Tabela 10 (A) - Latência de chegada à plataforma durante o treino sem EA

Comparação entre os dias 1 e 5 (P60 a P65) do LAM segundo o dia, o tipo de crise convulsiva e o estado nutricional em ratos Wistar SEM EA

Crise	Dia	Nutridos		Desnutridos	
		n	Latência(s)	n	Latência(s)
Controle	1	11	46,5±2,7	11	47,6±2,6
	2	11	29,5±3,9	11	30,8±3,7
	3	11	20,4±3,3	11	26,9±3,1
	4	11	21,2±2,9	11	21,6±2,7
	5	11	13,2±3,2	11	22,8±3,0
CP	1	09	49,9±2,8	09	55,7±2,8
	2	09	42,1±4,0	09	47,3±4,0
	3	09	25,0±3,5	09	35,2±3,5
	4	09	27,7±3,0	09	29,4±3,0
	5	09	17,9±3,3	09	27,8±3,3
SE	1	10	45,9±2,7	12	46,1±2,4
	2	10	37,9±3,9	12	31,1±3,5
	3	10	25,4±3,3	12	23,0±3,0
	4	10	21,0±2,9	12	19,5±2,6
	5	10	20,6±3,1	12	19,9±2,9

Os dados são apresentados como média±erro padrão. Efeito da crise na latência do aprendizado, $p=0<0,001$; efeito do estado nutricional na latência do aprendizado, $p=0,093$; interação entre crise e desnutrição, $p=0,076$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com triplo critério de classificação.

Tabela 10 (B) - Latência de chegada à plataforma durante o treino com EA

Comparação entre os dias 1 e 5 (P60 a P65) do LAM segundo o dia, o tipo de crise convulsiva e o estado nutricional em ratos Wistar COM EA

Crise	Dia	Nutridos		Desnutridos	
		n	Latência(s)	n	Latência(s)
Controle	1	15	46,0±2,5	09	44,2±3,2
	2	15	29,2±3,0	09	30,4±3,8
	3	15	23,4±2,0	09	19,4±2,6
	4	15	15,7±1,8	09	14,4±2,3
	5	15	9,7±1,5	09	10,6±1,9
CP	1	11	48,6±3,3	08	45,2±3,0
	2	11	35,7±4,0	08	40,5±3,6
	3	11	27,0±2,8	08	22,7±2,5
	4	11	18,2±2,4	08	20,0±2,2
	5	11	17,7±2,0	08	17,0±1,8
SE	1	13	43,7±2,7	09	52,3±3,2
	2	13	27,1±3,2	09	44,6±3,8
	3	13	20,8±2,2	09	24,7±2,7
	4	13	17,0±1,9	09	19,8±2,3
	5	13	12,3±1,6	09	17,7±1,9

Os dados são apresentados como média±erro padrão. Efeito da crise na latência do aprendizado, $p=0,024$; efeito do estado nutricional na latência do aprendizado, $p=0,171$; interação entre crise e desnutrição, $p=0,039$. Efeito global do EA, $p=0,001$. Interação entre crise e EA, $p=0,134$; interação entre estado nutricional e EA, $p=0,782$; interação entre crise, estado nutricional e EA, $p=0,004$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com triplo critério de classificação.

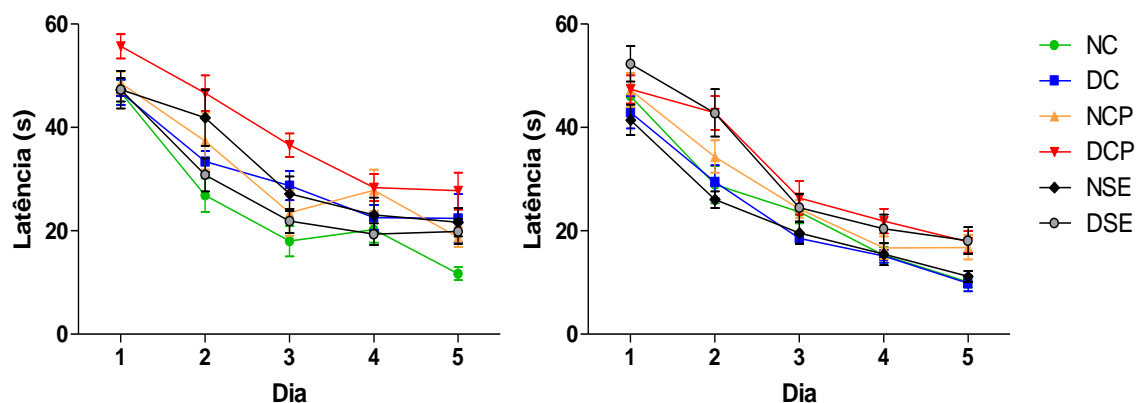


Figura 18 Curvas de aprendizado.

Médias das latências de escape para a plataforma oculta do labirinto aquático de Morris em relação ao dia de treino nos grupos: Nutrido Controle (NC), Desnutrido Controle (DC), Nutrido Crise Precoce (NCP), Desnutrido Crise Precoce (DCP), Nutrido Status Epilético (NSE) e Desnutrido Status Epilético (DSE), SEM EA (A) e COM EA (B). (A) Efeito das crises convulsivas no aprendizado ($P[\text{crises convulsivas}] < 0,001$) Efeito do estado nutricional no aprendizado ($P[\text{desnutrição}] = 0,093$). (B) Efeito das crises convulsivas no aprendizado ($P[\text{crises convulsivas}] = 0,024$). Efeito do estado nutricional no aprendizado ($P[\text{desnutrição}] = 0,171$). Efeito do EA no aprendizado ($P[\text{EA}] = 0,009$).

5.5.2 Efeito do estado nutricional, das crises convulsivas precoces e do enriquecimento ambiental na retenção da memória espacial

A tabela 11 e a figura 19 mostram que os animais desnutridos passaram significativamente menos tempo no quadrante alvo (grupos DC e DCP SEM EA: $\pm \%$, DC e DCP COM EA: $\pm \%$) do que os animais nutridos (grupos NC e NCP SEM EA: $\pm \%$, NC e NCP COM EA: $\pm \%$) ($p < 0,001$), durante o teste de prova realizado em P66 (i.e. 1 dia após o último dia de treino no LAM). Os animais submetidos às crises convulsivas precoces de P8 a P10 (grupos DCP e NCP SEM EA: $\pm \%$, DCP e NCP COM EA: $\pm \%$) passaram menos tempo no quadrante alvo que os animais controles (grupos DC e NC SEM EA: $\pm \%$, DC e NC COM

EA: \pm %; $p=0,005$). Não houve interação significativa entre desnutrição e crises convulsivas em relação à retenção da memória espacial ($p=0,095$). Quanto ao EA, os ratos que passaram pelo ambiente enriquecido despenderam significativamente mais tempo no quadrante alvo que os ratos SEM EA (grupos NC, NCP, DC e DCP SEM EA: $39,8 \pm 2,0\%$) e COM EA (grupos NC, NCP, DC e DCP COM EA: $47,6 \pm 2,0\%$). Não foi observada interação entre o estado nutricional e EA ($p=0,435$), entre crises precoces e EA ($p=0,432$), ou entre estado nutricional, crises precoces e EA ($p=0,838$).

Tabela 11 Teste de Prova em P66 (I)

Comparação do tempo no Quadrante Alvo (QA) (%) observado no teste de prova do LAM segundo o Estado Nutricional e Enriquecimento Ambiental (EA) em ratos Wistar submetidos a Crises Precoces (CP)

Crise	Total			Nutridos			Desnutridos		
	n	% tempo QA	dif	n	% tempo QA	dif	n	% tempo QA	dif
<i>Sem EA</i>									
Controle	22	45,2 \pm 2,8	–	11	49,6 \pm 4,1	–	11	40,8 \pm 3,9	–
CP	18	34,4 \pm 3,1	-10,8	9	44,4 \pm 4,3	-5,2	9	24,5 \pm 4,3	-16,3
Total	40	39,8 \pm 2,0		20	47,0 \pm 3,0		20	32,6 \pm 2,9	
<i>Com EA</i>									
Controle	24	50,7 \pm 2,7	–	15	53,4 \pm 3,4	–	9	48,0 \pm 4,3	–
CP	18	44,6 \pm 3,1	-6,1	8	51,7 \pm 4,6	-1,7	10	37,5 \pm 4,1	-10,5
Total	42	47,6 \pm 2,0		23	52,6 \pm 2,8		19	42,7 \pm 3,0	

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. dif: diferença em relação ao controle. Efeito da crise no tempo no quadrante alvo, $p=0,005$; efeito do estado nutricional, $p<0,001$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,095$. Efeito do EA no tempo do quadrante alvo, $p=0,009$; efeito interação entre o estado nutricional e EA, $p=0,435$, efeito interação entre crise e EA, $p=0,432$. Efeito interação entre o estado nutricional, crise e EA, $p=0,838$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com triplo critério de classificação.

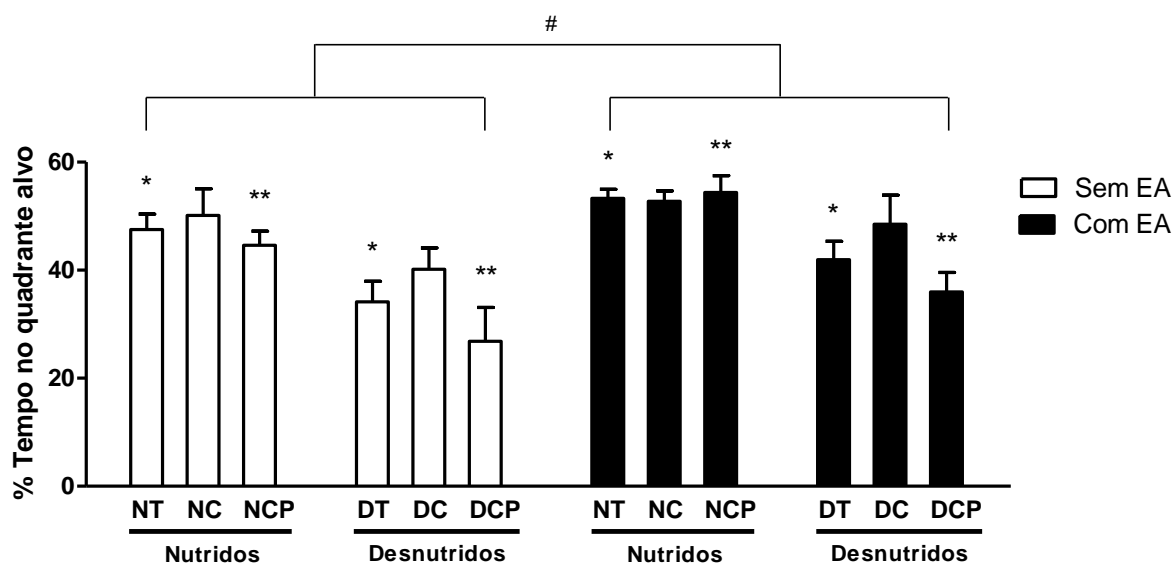


Figura 19 Teste de prova (I)

As médias da porcentagem de tempo despendido no quadrante alvo foram maiores nos animais submetidos ao enriquecimento ambiental (EA). Porcentagem de tempo despendido no quadrante alvo nos grupos: Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos, NC e NCP), Nutrido Controle (NC), Nutrido Crise Precoce (NCP), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos, DC e DCP), Desnutrido Controle (DC), Desnutrido Crise Precoce (DCP), em ratos Wistar, SEM e COM EA. Efeito da desnutrição no tempo no QA (* $P[\text{desnutrição}] < 0,001$). Efeito das crises convulsivas no tempo no QA (** $P[\text{crises convulsivas}] = 0,005$). Efeito do EA no tempo no QA (# $P[\text{EA}] = 0,009$).

5.5.3 Efeito do estado nutricional, do status epilético e do enriquecimento ambiental na retenção da memória espacial

A tabela 12 e a figura 20 mostram um valor limítrofe para a diferença entre os animais desnutridos (grupos DC e DSE SEM EA, DC e DSE COM EA: $43,2 \pm 1,8\%$) e os animais nutridos (grupos NC e NSE SEM EA, NC e NSE COM EA: $47,4 \pm 1,6\%$; $p < 0,083$), quanto ao tempo despendido no quadrante alvo durante o teste de prova realizado em P66 (i.e. 1 dia após o último dia de treino no LAM). Os ratos submetidos ao status epilético em P16 (grupos DSE e NSE SEM EA: $34,8 \pm 2,4\%$; DSE e NSE COM EA: $50,5 \pm 2,4\%$) passaram significativamente menos tempo no quadrante alvo do que os animais controles (grupos DC e

NC SEM EA: $45,2 \pm 2,4\%$; DC e NC COM EA: $50,7 \pm 2,4\%$; $p=0,03$). Não foi verificada interação significativa entre crise e o estado nutricional em relação à retenção da memória espacial ($p=0,22$). Quanto ao EA, observou-se diferença no tempo no quadrante alvo entre os animais SEM EA (grupos NC, NSE, DC e DSE SEM EA: $40,0 \pm 1,7\%$) e COM EA (grupos NC, NSE, DC e DSE COM EA: $50,6 \pm 1,7\%$; $p<0,001$), sendo significativamente maior neste último. Da mesma forma, foi observada interação entre crise e EA ($p=0,035$), mas não entre estado nutricional e EA ($p=0,359$), ou entre estado nutricional, SE e EA ($p=0,106$).

Tabela 12 Teste de Prova em P66 (II)

Comparação do tempo no Quadrante Alvo (QA) (%) observado no teste de prova do LAM segundo o Estado Nutricional e Enriquecimento Ambiental (EA) em ratos Wistar submetidos a Status Epilético (SE)

Crise	Total			Nutridos			Desnutridos		
	n	% tempo QA	dif	n	% tempo QA	dif	n	% tempo QA	dif
<i>Sem EA</i>									
Controle	22	$45,2 \pm 2,4$	–	11	$49,6 \pm 3,5$	–	11	$40,8 \pm 3,4$	–
SE	18	$34,8 \pm 2,4$	-10,4	9	$32,3 \pm 3,5$	-17,3	9	$37,2 \pm 3,2$	-3,6
Total	40	$40,0 \pm 1,7$		20	$41,0 \pm 2,5$		20	$39,0 \pm 2,3$	
<i>Com EA</i>									
Controle	24	$50,7 \pm 2,4$	–	15	$53,4 \pm 2,9$	–	9	$48,0 \pm 3,7$	–
SE	18	$50,5 \pm 2,4$	-0,2	8	$54,2 \pm 3,0$	0,8	10	$46,9 \pm 3,7$	-1,1
Total	42	$50,6 \pm 1,7$		23	$53,8 \pm 2,1$		19	$47,4 \pm 2,6$	

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. dif: diferença em relação ao controle. Efeito da crise no tempo no quadrante alvo, $p=0,03$; efeito do estado nutricional, $p=0,083$; interação entre crise e estado nutricional, $p=0,22$. Efeito do EA no tempo do quadrante alvo, $p<0,001$; efeito interação entre o estado nutricional e EA, $p=0,359$, efeito interação entre crise e EA, $p=0,035$. Efeito interação entre o estado nutricional, crise e EA, $p=0,106$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com triplo critério de classificação.

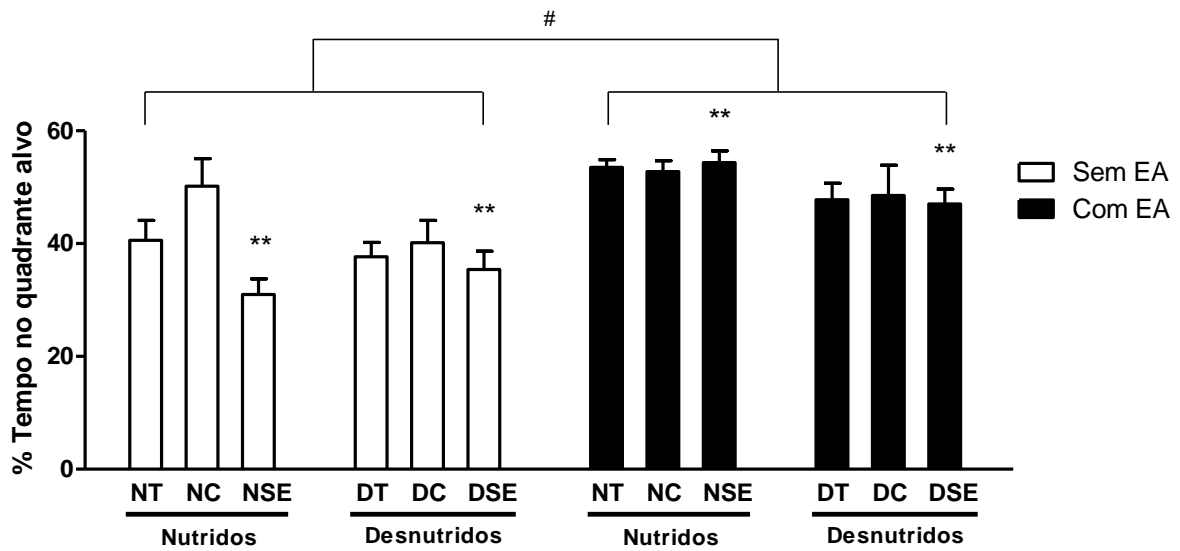


Figura 20 Teste de prova (II)

As médias da porcentagem de tempo despendido no quadrante alvo foram maiores nos animais submetidos ao enriquecimento ambiental (EA). Porcentagem de tempo despendido no quadrante alvo nos grupos: Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos, NC e NSE), Nutrido Controle (NC), Nutrido Status Epilético (NSE), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos, DC e DSE), Desnutrido Controle (DC), Desnutrido Status Epilético (DSE), em ratos Wistar, SEM e COM EA. Efeito da crise no tempo no QA (** $P[\text{crise}] = 0,03$). Efeito do EA no tempo no QA ($\#P[\text{EA}] < 0,001$).

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os dados deste experimento demonstram que o enriquecimento ambiental realizado entre o trigésimo (P30) e o sexagésimo (P60) dia de vida melhora a retenção da memória espacial em ratos desnutridos no período neonatal e submetidos a dois diferentes modelos de crises convulsivas induzidas por flurothyl: crises precoces recorrentes no oitavo, nono e décimo dias de vida (P8, P9 e P10) ou status epilético no décimo sexto dia de vida (P16).

O LAM é um teste aplicado para avaliar a memória espacial hipocampo-dependente (Morris, 1984), sendo uma tarefa que traça um paralelo próximo à memória episódica de seres humanos (Jeltsch, Bertrand *et al.*, 2001). A curva de aprendizado avalia o desempenho para a localização da plataforma durante cinco dias de treinamento. No presente experimento as curvas na fase de treinamento no labirinto aquático de Morris mostraram pior desempenho dos animais que não foram submetidos ao ambiente enriquecido, bem como daqueles que sofreram crises convulsivas precoces ou status epilético, demonstrado por maiores médias de latência durante o treino, conforme apresentado na tabela 10 (A e B) e figura 18 (A e B). Isso mostra que esses animais foram mais lentos durante o treino e não chegaram a obter o desempenho semelhante aos controles sem crises ou àqueles animais que foram estimulados ambientalmente. O estado nutricional não afetou o aprendizado no LAM, independentemente do tipo de crise ou estimulação ambiental. Já o tipo de crise convulsiva, afetou a evolução do aprendizado em ambos estados de estimulação ambiental e ambos estados nutricionais ($p < 0,05$), mostrando que os animais com crises apresentam latências para achar a plataforma maiores do que aquelas dos animais sem crises. Nos animais SEM EA, entretanto, os valores de significância encontrados foram limítrofes tanto para o estado nutricional como fator independente ($p = 0,093$), bem como para sua interação com o tipo de crise ($p = 0,076$). Supondo-se que isso seja devido a um erro tipo II, perda de poder do teste pelo reduzido número da amostra, podemos inferir que há uma tendência de animais desnutridos terem médias de latência mais elevadas em relação aos grupos nutridos e que os animais com crises epiléticas tenderiam a apresentar desempenho ainda pior, além do já induzido pela desnutrição. Isso estaria de acordo com um estudo prévio do laboratório de Neurociências do IPB- PUCRS (Hemb, 2007) onde alteração semelhante foi observada. Os animais haviam sofrido o mesmo paradigma de desnutrição e de crises convulsivas, mas foram testados no LAM ainda antes da fase adulta, entre P21 e P26. Os valores encontrados pelos autores na

latência de aprendizado demonstraram que todos os animais aprenderam, mas a diminuição progressiva na latência de escape foi mais evidente nos animais nutridos que nos desnutridos, assim como nos animais sem crises convulsivas.

No presente estudo observamos que nos animais COM EA a interação entre estado nutricional e tipo de crise foi significativa ($p=0,039$), pois as médias das latências são menores nos animais nutridos em relação aos desnutridos, e tal diferença é aumentada pela ocorrência de crises epiléticas. Por fim, o fato de que todos os animais apresentaram uma queda progressiva ao longo dos dias na latência de escape para a plataforma, indicado pela significância do progresso do treino como fator independente ($p<0,001$), nos leva a inferir que a tarefa foi aprendida por todos os grupos e que o desempenho inferior descrito acima não chegou a afetar o aprendizado de maneira que o mesmo não ocorresse. Isso é corroborado pela falta de interação entre o estado nutricional, tipo de crise convulsiva e enriquecimento ambiental com o progresso do treino, mostrando que todos os grupos apresentam variações da latência entre o primeiro e último dia de treino de igual magnitude. Apesar do grupo COM EA apresentar a interação significativa entre progresso do treino e estado nutricional, isto foi devido ao fato de que o grupo desnutrido apresentou uma latência de escape no último dia do treinamento igual ao dia imediatamente anterior, mas ainda muito menor do que os dias anteriores, o que nos leva a inferir que houve aprendizado de maneira semelhante aos demais grupos em que tais interações não foram observadas.

O teste de prova, realizado no dia seguinte após o último dia de treino, provê uma medida da retenção do aprendizado da memória viso-espacial dependente do hipocampo (Morris, 1984). Os ratos submetidos ao modelo de CP em P8, P9 e P10, apresentaram menor retenção da memória viso-espacial testada após 5 dias de treinamento no LAM, quando avaliados na fase adulta (P66) ($p=0,005$). Esse achado demonstra que há efeito deletério das crises convulsivas induzidas no cérebro imaturo sobre os processos cognitivos avaliados tardiamente, no cérebro maduro. Acreditamos que o acometimento hipocampal está provavelmente implicado nessa seqüência de acontecimentos, pois como já extensivamente revisado na bibliografia, as crises alteram esta estrutura que é central no processamento da memória espacial (Nunes, Liptakova *et al.*, 2000; McCabe, Silveira *et al.*, 2001; Ben-Ari e Holmes, 2006). Alterações cognitivas, incluindo aprendizado e memória, após crises convulsivas e desnutrição foram citadas por diversos autores em estudos clínicos e experimentais (Holmes, 1991; Bedi, 1992; Holmes, Yang *et al.*, 2002; Huang, Lai *et al.*, 2003; Akman, Zhao *et al.*, 2004; Hermann e Seidenberg, 2007). De modo semelhante aos

resultados que encontramos, Hoffmann et al (Hoffmann, Zhao *et al.*, 2004) observaram prejuízo na performance no LAM em animais que sofreram crises repetidas. Holmes et al (Holmes, Gairisa *et al.*, 1998) também realizaram experimento induzindo crises repetidas com flurothyl no período neonatal e avaliaram os animais quanto a memória espacial na fase adulta, igualmente observando prejuízo nos ratos que haviam sofrido crises repetidas. Há uma relativa carência de estudos que verifiquem os efeitos das crises repetidas precoces, enquanto isso não ocorre quanto aos efeitos do SE, como veremos a seguir.

Quanto à nutrição, verificamos que os animais desnutridos, independentemente de terem ou não sofrido CP e de terem ou não passado pelo ambiente enriquecido, apresentam prejuízo na retenção de memória quando avaliada no teste do LAM ($p < 0,001$). Da mesma forma que a CP, a privação nutricional ocorreu em fase precoce na vida desses animais, mas provavelmente o dano por ela causado teve repercussão suficiente para prejudicar a retenção da memória, mesmo quando testada já na fase adulta. Como observado previamente por outros pesquisadores, a carência de nutrientes precoce nesses roedores implica em déficit cognitivo com duração prolongada, e isso não parece não ser revertido com a reabilitação nutricional posterior (Bedi, 1992; Fukuda, Francolin-Silva *et al.*, 2002; Akman, Zhao *et al.*, 2004). O teste de prova é o parâmetro de maior força avaliado no LAM, fornecendo a informação da capacidade de retenção da memória espacial. Assim como no nosso experimento, Lukonayov & Andrade (Lukoyanov e Andrade, 2000) observaram alteração na retenção da memória no dia do teste de prova de ratos desnutridos, sem ocorrer alteração significativa durante os dias de aprendizado. A análise histológica desses cérebros revelou diminuição do número de células no GD, CA1 e CA3, e os autores correlacionaram esses achados ao prejuízo cognitivo observado. Os autores também verificaram déficit em outras tarefas comportamentais nos mesmos animais (teste de campo aberto e esquiva inibitória), alterações que possivelmente também estão ligadas aos danos hipocâmpais encontrados.

Avaliando a interação entre o estado nutricional e as crises precoces, encontramos um valor limítrofe para significância estatística ($p = 0,095$). Aparentemente o que ocorre é que ambos os fatores influenciam de modo semelhante na retenção da memória espacial, mas de maneira independente. Em outras palavras, o rato desnutrido tem pior desempenho tendo ou não sofrido CP, e o rato que sofreu CP tem pior desempenho sendo ou não desnutrido, em relação aos seus controles, sem, entretanto, que tais fatores influenciem mutuamente o desempenho no teste.

O EA mostrou ser uma importante estratégia de reabilitação cognitiva nos ratos que sofreram crises repetidas e desnutrição precocemente. O fator enriquecimento ambiental, assim como a CP e a desnutrição, também atuou de forma independente no nosso experimento, mas de modo a melhorar a retenção da memória espacial nos animais adultos ($p=0,009$). Independentemente do estado nutricional e de terem sofrido crises recorrentes precoces ou não, todos os ratos submetidos ao EA ficaram mais tempo no quadrante-alvo no dia do teste. Observando a figura 18, nos animais SEM EA vemos que os grupos desnutridos e/ou com crises precoces (DC, DCP e NCP) têm desempenho inferior ao atingido pelo controle (NC). Após o EA, os grupos NCP e DC chegam a valores próximos aos seus controles. O grupo NC SEM EA já apresentava o desempenho considerado normal para a tarefa estudada. Mesmo assim, vemos aumento na porcentagem de tempo gasto no quadrante alvo após o EA. O grupo DCP, entretanto, apesar de ter demonstrado um aumento na porcentagem do tempo no quadrante-alvo após o tratamento com o ambiente enriquecido, seguiu apresentando permanência inferior que os demais. Dessa forma, vemos que o EA auxilia na recuperação cognitiva dos ratos submetidos à desnutrição neonatal e crises recorrentes precoces, contudo, especificamente no grupo DCP, esse tratamento não é suficiente para reverter o dano pré-existente. Não encontramos nenhum estudo que avalie o efeito do EA sobre o prejuízo cognitivo induzido pela desnutrição e crises recorrentes precoces. Como vimos previamente, os efeitos deletérios de crises e da carência nutricional no cérebro em desenvolvimento lesam principalmente a região hipocampal, com relatos de perda neuronal nas regiões do GD, CA1 e CA3 (Ben-Ari, 1985; Lukoyanov e Andrade, 2000; Garcias Da Silva, Nunes *et al.*, 2004), disfunções nos neurotransmissores como o glutamato e em receptores (Millan, Chapman *et al.*, 1993; Levitsky e Strupp, 1995; Marks, Friedman *et al.*, 1996), redução no número de sinapses (Warren e Bedi, 1984) e dendritos (Leuba e Rabinowicz, 1979a). Por outro lado, inúmeras alterações decorrentes da exposição ao ambiente enriquecido já foram publicadas, como alterações nos neurotransmissores e receptores (Rosenzweig e Bennett, 1996), aumento de fatores neurotróficos (Young, Lawlor *et al.*, 1999), da neurogenese (Kempermann e Gage, 1999; Van Praag, Kempermann *et al.*, 2000), da gliogênese e arborizações dendríticas (Nakamura, Kobayashi *et al.*, 1999), da densidade sináptica (Rosenzweig e Bennett, 1996; Ip, Giza *et al.*, 2002) e da plasticidade neuronal (Pinaud, Penner *et al.*, 2001). É possível que a melhora cognitiva observada após o EA no presente estudo decorra de múltiplas alterações concomitantes como as descritas acima, de maneira a reverter ou minimizar os danos ocasionados pela desnutrição crises. Estudos mais específicos seriam importantes na elucidação desse processo.

Semelhantemente ao encontrado na comparação com o paradigma de crises precoces, o efeito deletério da crise de status epilético induzida no período neonatal (P16) persistiu até a fase adulta dos animais, levando ao prejuízo cognitivo avaliado pelo LAM. Nesses animais observamos menor tempo permanecido no quadrante alvo em relação aos controles. O prejuízo sobre a memória espacial desses animais foi independente do estado nutricional, de forma que tanto os animais nutridos quanto àqueles submetidos ao modelo de desnutrição na fase de lactação apresentaram menor tempo de permanência no quadrante alvo no teste realizado um dia após a conclusão do treino. Uma série de experimentos corroboram que a ocorrência de SE, em fase precoce ou tardia, leva a subsequente dano cognitivo (Stafstrom, Chronopoulos *et al.*, 1993; Rice, Floyd *et al.*, 1998; Yang, Tandon *et al.*, 1998; Lynch, Sayin *et al.*, 2000; Faverjon, Silveira *et al.*, 2002; Rutten, Van Albada *et al.*, 2002; Liu, Muller *et al.*, 2003; Holmes, 2004). Todavia, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são incertos, fazendo-se necessária maior investigação nessa área.

O tratamento com o ambiente enriquecido foi novamente benéfico, revertendo o déficit da memória espacial associada ao aprendizado do LAM. Da mesma forma que no estudo do paradigma de crises precoces, o EA melhorou o desempenho de todos os grupos estudados. Nos animais que sofreram SE (NSE e DSE) o ganho após o EA foi consideravelmente maior em relação aos controles, de maneira que vemos interação entre os fatores crise (no caso, SE) e EA ($p=0,035$). A melhora após o EA foi de tal maneira importante que todos os grupos atingiram níveis normais para a tarefa aplicada. Nesse caso, portanto, observamos que o EA foi capaz de reverter os danos secundários à carência nutricional neonatal, bem como os efeitos decorrentes do status epilético em P16.

Em estudos prévios foi demonstrado que o EA é capaz de minimizar os danos cognitivos e prejuízo de memória em animais submetidos a crises (Faverjon, Silveira *et al.*, 2002; Rutten, Van Albada *et al.*, 2002; Koh, Chung *et al.*, 2005) e à privação nutricional (Levitsky e Barnes, 1972; Crnic, 1983; Carughi, Carpenter *et al.*, 1989; Levitsky e Strupp, 1995). Não encontramos, todavia, nenhum estudo que relate o efeito do ambiente enriquecido na associação entre desnutrição e crises convulsivas, parecendo ser este o primeiro estudo demonstrando o benefício cognitivo do EA havendo associação de ambas condições.

Diversos autores, como revisado, enfatizaram a melhora no aprendizado e retenção da memória espacial após EA (Falkenberg, Mohammed *et al.*, 1992; Young, Lawlor *et al.*, 1999; Xu, Ye *et al.*, 2009). Essa constatação foi correlacionada a um aumento na expressão de RNA mensageiro para fatores neurotróficos (Falkenberg, Mohammed *et al.*, 1992), ao

aumento da fosforilação da proteína ERK2, um possível modulador da plasticidade cognitiva (Wang, Lai *et al.*, 2007) e ao aumento da neurogênese e de fatores de transcrição importantes na formação da memória de longa duração como CREB (Faverjon, Silveira *et al.*, 2002), entre outros (Rosenzweig e Bennett, 1996; Brown, Cooper-Kuhn *et al.*, 2003). Tais benefícios podem ter ocorrido neste experimento, e novamente concluímos que estudos mais detalhados seriam importantes no entendimento dos dados encontrados.

O paradigma de desnutrição pós-natal, aplicado entre o segundo (P2) e décimo quinto (P15) dias de vida diminui o ganho de peso corporal a partir do quarto dia de vida (P4), e há persistência desse déficit ponderal até o nonagésimo dia de vida (P90), a despeito do retorno a dieta normal iniciada após P16. Ademais, verificamos que o paradigma de desnutrição também levou à redução significativa do peso cerebral em P90. A desnutrição precoce afetou, ainda, o limiar para início das crises convulsivas precoces induzidas pelo flurothyl em P8, P9 e P10. Não houve efeito significativo, entretanto, no limiar para status epilético em P16.

O peso corporal dos animais foi avaliado a partir de P2 até P90. Observamos uma redução significativa do peso corporal dos desnutridos em relação aos nutridos a partir de P4, perdurando até P90. Isso ocorreu apesar normalização da dieta a partir de P16, dia no qual os animais que vinham sofrendo o paradigma de desnutrição foram realocados com as fêmeas nutrizas, aonde permaneceram até P21, período final da amamentação. Após P22, ambos os grupos tinham acesso a ração e água *ad libitum*. Estudos prévios com este modelo de desnutrição demonstraram a persistência da diferença de peso entre os grupos até P30 (Nunes, Batista *et al.*, 2002). Sharma et al (Sharma, Behari *et al.*, 1990; Sharma, Selvamurthy *et al.*, 1990) observaram a diferença de peso mantida até a idade adulta, em P90, igualmente ao relatado neste experimento. Dessa forma, concluímos que o modelo de desnutrição utilizado foi efetivo, e que os efeitos por ele gerados persistiram até a idade adulta dos animais, mesmo após o retorno da normalização nutricional. O modelo de restrição alimentar que utilizamos é, de certa forma, similar ao processo de desnutrição que afeta famílias pobres em todo mundo (Grantham-Mcgregor, 1995; Muller e Krawinkel, 2005). É válido lembrar que a forma de avaliação do estado nutricional, realizado através da aferição do peso corporal, é também similar ao método de avaliação da desnutrição em seres humanos. Uma questão controversa na utilização deste paradigma é que a separação dos filhotes de suas mães, por si só, pode levar a alterações cognitivas prejudiciais, secundárias a fatores como o estresse gerado nos filhotes devido à separação (Huang, Holmes *et al.*, 2002). Rüedi-Bettschen e colaboradores

(Ruedi-Bettschen *et al.*, 2005) observaram que a separação materna precoce durante 4 horas levou a sintomas de anedonia nos animais na fase adulta, o que os autores correlacionaram a sintomas depressivos. Diversos autores verificaram em diferentes espécies de roedores e distintos paradigmas de separação da mãe e filhotes, a propensão a piores desempenhos em tarefas cognitivas como o aprendizado e memória espacial (Oitzl *et al.*, 2000; Rots *et al.* 1996; Sanchez *et al.* 2001).

Outros estudos valendo-se do mesmo modelo de privação materna precoce durante 24 horas consecutivas encontraram resultados divergentes quanto a alterações comportamentais subseqüentes (Kinney, Wilkinson *et al.*, 1999; Ruedi-Bettschen *et al.*, 2005; Varty e Geyer, 1998). Ellenbroek & Cools (Ellenbroek e Cools, 2000), demonstraram déficits cognitivos que se equivalem a sintomas de esquizofrenia nos seres humanos. Outros autores, entretanto, não confirmaram tais achados (Kinney, Wilkinson *et al.*, 1999; Varty e Geyer, 1998). Seguindo modelo similar de afastamento materno durante 24 horas (entre P9 e P10), Llorente e colaboradores (Llorente, Gallardo *et al.*, 2009) observaram indução de alterações gliais e degeneração neuronal nas células hipocâmpais e cerebelares, alterações vistas de forma mais evidente nos roedores machos. Zang e colegas (Zhang, Levine *et al.*, 2002) também demonstraram haver alterações histológicas como o aumento da taxa de apoptose de neurônios e glias após a privação materna. Benetti e colaboradores (Benetti, Mello *et al.*, 2009), adicionalmente, demonstraram que a administração de anticolinesterásicos antes da realização do teste cognitivo foi capaz de reverter o déficit de memória secundário a aplicação de um modelo de separação dos filhotes de ratos Wistar por um período de 3h/dia de P1 a P10. Os autores sugerem que a separação da mãe e filhotes afeta o sistema colinérgico dos animais já na fase adulta.

Dessa forma, uma série de trabalhos demonstra alterações secundárias à privação materna. Entretanto, vemos a utilização de distintos paradigmas de separação variando tanto quanto ao tempo de afastamento quanto ao período de vida no qual o experimento é aplicado, o que dificulta a comparação entre os estudos bem como o estabelecimento de resultados conclusivos a esse respeito. Serão necessários mais experimentos nessa área no sentido de elucidar as alterações específicas decorrentes da privação materna precoce por si. Está claro que há conseqüências estressoras de tal privação para os filhotes, contudo, acreditamos que inclusive esses efeitos podem ser extrapolados para o panorama onde ocorre desnutrição na população infantil, quando habitualmente o que vemos é ausência materna por questões

econômicas e sociais e conseqüente limitação da lactação (Giugliani, Issler *et al.*, 1996; Issler, Giugliani *et al.*, 1996).

O peso corporal não foi, entretanto, modificado pela ocorrência tanto de crises convulsivas precoces em P8, P9 e P10, quanto pelo status epilético induzido em P16 nos respectivos grupos. Não verificamos diferenças significativas no peso corporal entre os animais livres de crises e os submetidos a CP ou a SE neste experimento.

O peso cerebral analisado em P90 foi maior nos animais nutridos comparado aos desnutridos. Ademais os animais COM EA apresentaram, também, o peso cerebral significativamente maior em P90 comparados aos SEM EA. Estudos prévios demonstram aumento da massa encefálica em decorrência da exposição ao ambiente enriquecido (Bennett, Rosenzweig *et al.*, 1969; Henderson, 1970; Katz e Davies, 1984). Estratificando a análise por crises, vemos diferenças no comportamento do peso cerebral entre os animais nutridos e desnutridos. Nos animais desnutridos que sofreram CP, houve aumento do peso cerebral em relação aos nutridos CP. Esse aumento ocorreu tanto nos grupos SEM EA quanto no COM EA, mas foi estatisticamente significativo apenas neste último. Tal alteração já havia sido relatada em experimento prévio do nosso grupo de pesquisa do IPB- PUCRS (Hemb, 2007), quando análise semelhante foi feita e os animais desnutridos que sofreram CP apresentaram peso cerebral maior que os nutridos CP. Hemb *et al.*, entretanto, haviam provocado crises precoces em P2, P3 e P4, e a análise do peso cerebral foi realizada em ratos jovens (P30) (Hemb, 2007). É interessante observar que esta alteração se mantém até a idade adulta desses animais. Nos animais que sofreram CP e posterior EA, o peso cerebral não foi igual nos grupos nutrido e desnutrido. Viu-se o peso significativamente maior nos animais desnutridos (dif de 0,01 entre controle e CP nutridos e dif de 0,13 entre controle e CP desnutridos). O EA nos animais desnutridos que sofreram CP foi marcadamente mais influente no ganho de peso cerebral que nos nutridos CP. No grupo que sofreu SE, também há discrepâncias no comportamento do peso cerebral entre os animais nutridos e desnutridos. Nesses animais verificou-se que a ocorrência de SE levou à diminuição do peso cerebral somente nos animais nutridos. Esse achado, entretanto, só foi significativo no grupo SEM EA. Nos animais com EA, o peso cerebral dos nutridos SE atingiu o peso dos animais controle, sugerindo um benefício importante do EA nesse grupo. Quanto aos animais desnutridos, o grupo que sofreu SE SEM EA apresentou peso cerebral maior que o COM EA. Este foi o único grupo de comparação que o EA não mostrou efeito de aumento do peso cerebral, mas não foi um achado estatisticamente significativo. A amostra utilizada no experimento era alocada de maneira

aleatória nos grupos de estudo. No caso específico dos animais desnutridos que sofreram SE, vemos que o peso inicial da ninhada que foi alocada para o tratamento SEM EA era superior aos animais alocados para o experimento COM EA. Tais discrepâncias nos achados do peso cerebral entre nutridos e desnutridos, com ou sem crises, podem ser explicadas devido ao fato de se tratarem de animais diferentes, com carga genética própria que diversificam o peso inicial do cérebro. Diferentemente da análise do peso corporal que pode ser feita pela variação do peso ao longo do experimento, excluindo-se da análise o peso de nascimento do animal, o peso cerebral só pode ser mensurado no final do experimento, de maneira que não sabemos os pesos cerebrais iniciais de cada rato.

A análise da relação entre o peso cerebral e o peso corporal demonstrou que esta relação foi maior nos animais desnutridos que nos nutridos. As observações da proporção da massa cerebral em relação à massa corpórea total datam do século 18, quando Albrecht von Haller, anatomista alemão, relatou pela primeira vez que essa proporção varia entre os animais ao estudar 22 espécies de mamíferos. Ele observou que há uma proporção inversa entre o peso corporal e cerebral dos animais, sendo maior o cérebro dos animais pequenos em relação aos seus corpos. O rato, na ocasião, foi o animal com maior relação do peso cerebral/corporal estudado (Lüps, 2009). A proporção estimada entre o peso cerebral e o peso corporal dos mamíferos é cerca de 0,67. Nunes et al (Nunes, Batista *et al.*, 2002), em 2002, publicaram um estudo que utilizou o mesmo paradigma de desnutrição realizado no presente experimento. Foi verificado, também, maior relação peso cerebral/corporal nos animais desnutridos, porém a aferição foi mensurada em ratos jovens (P30). Existem relatos de alterações na proporção da massa cerebral em relação à massa corpórea total relacionados à desnutrição, mas esta é uma questão ainda não clara (Watson e Livesey, 1984). Acreditamos que de alguma forma o organismo “poupa” o tecido cerebral quando ocorre o advento da desnutrição, conforme descrito por Hales & Barker (Hales e Barker, 1992), na proposta de existência de um “fenótipo econômico”. No presente experimento encontramos significância estatística ao comparar essa relação em animais nutridos e desnutridos, sendo maior nos desnutridos. Esse valor foi significativo nos animais COM EA, enquanto atingiu valores limítrofes para a significância dos ratos SEM EA. Acreditamos que esse valor seria significativo com o aumento da amostra, já que o efeito do EA em si, na avaliação da relação estudada, não foi significativo.

Os animais desnutridos apresentaram um limiar reduzido para o início das crises convulsivas precoces induzidas por flurothyl. As crises foram induzidas em P8, P9 e P10,

período no qual os ratos desnutridos já tinham o peso significativamente menor em relação aos nutridos. O limiar mostrou-se significativamente menor desde o primeiro dia das crises recorrentes e não houve alteração significativa no mesmo com a repetição das crises nos dias subsequentes. Diversos estudos demonstraram o efeito deletério da desnutrição, tanto pré quanto pós-natal, diminuindo o limiar para as crises convulsivas (Ogura e Orsingher, 1980; Aicardi, 1988; Bronzino, Austin-Lafrance *et al.*, 1990; Palencia, Calvillo *et al.*, 1996). Os primeiros estudos datam da década de 1970 (Stern, Forbes *et al.*, 1974) e foram realizados com a indução de crise em ratos através de eletroconvulsoterapia. Os animais submetidos previamente à restrição protéica apresentaram redução do limiar convulsivo, e o achado não se reverteu após a reabilitação nutricional, sugerindo a ocorrência de uma alteração duradoura. Os mesmos pesquisadores, a seguir, aplicaram o modelo de desnutrição e induziram crises de outras formas, com kindling e pentylenetetrazol, não encontrando, entretanto, alteração no limiar dos ratos desnutridos (Forbes, Stern *et al.*, 1978). Outro modelo de desnutrição protéica demonstrou, outrossim, a diminuição do limiar convulsivo induzido por pentylenetetrazol, nos animais desnutridos, possivelmente de maneira secundária a atrofia nos neurônios do hipocampo, córtex e cerebelo (Palencia, Calvillo *et al.*, 1996).

Todavia, não foi observada diferença entre o limiar para indução do status epilético entre os ratos nutridos e desnutridos, provocado em P16. Tal achado já foi relatado em estudos prévios realizados com o modelo do flurothyl (Nunes, Batista *et al.*, 2002; Hemb, 2007). Isso provavelmente ocorre devido às propriedades do flurothyl, um éter que ocasiona uma hiperexcitabilidade neuronal ao inibir a neurotransmissão GABA A (Araki, Kobayashi *et al.*, 2002; Hashimoto, Araki *et al.*, 2006) e que necessita administrações repetidas para reduzir o limiar convulsivo (Grantham-Mcgregor, 1995; Araki, Kobayashi *et al.*, 2002). Desta maneira, acreditamos que o limiar foi reduzido nas crises precoces exatamente por se tratarem de crises repetidas (3 crises/dia por 3 dias consecutivos) diferente do modelo de indução do SE (uma crise induzida em P16). A escolha do uso do flurothyl justifica-se no propósito do estudo de verificar os efeitos de crises que ocorrem no período inicial da vida do rato, que corresponde ao período neonatal de seres humanos. No período neonatal dos seres humanos, a ocorrência de crises convulsivas é alta e a etiologia variada, sendo as crises provocadas prevalentes (Holmes, 1994; Lombroso, 1996a). Dessa forma, o flurothyl aparece como um agente causador de crises breves, como um modelo para esse tipo de crise e não como um fármaco epileptogênico. Isto é, não apresenta o efeito de tornar o animal epilético (Hashimoto, Araki *et al.*, 2006).

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste experimento concluímos que:

1. O Enriquecimento ambiental apresenta efeito positivo melhorando a retenção da memória espacial de ratos submetidos à desnutrição precoce e aos dois modelos de crises convulsivas estudados. O tratamento com ambiente enriquecido foi capaz de reverter totalmente o déficit cognitivo nos animais desnutridos que sofreram status epilético, enquanto melhorou o desempenho daqueles que tiveram crises precoces repetidas. Até onde sabemos, este foi o primeiro experimento que demonstrou a melhora na memória espacial com o uso do ambiente enriquecido em ratos que sofreram desnutrição e crises convulsivas em idade precoce.

2. A desnutrição precoce, assim como as crises convulsivas, apresenta efeito deletério no aprendizado e retenção de memória espacial. Tanto o modelo de crises convulsivas recorrentes quanto o de status epilético induzidos no cérebro do rato jovem, atuam de forma prejudicial à aquisição e retenção da memória espacial, avaliada na fase adulta.

3. A desnutrição no período de lactação atuou, de maneira isolada, sobre o peso corporal dos ratos levando a uma desvantagem significativa no ganho ponderal corporal, quando comparados aos controles, até a fase adulta, a despeito da normalização da dieta após P16.

4. A desnutrição precoce atua de forma isolada na redução do peso cerebral do rato adulto de maneira que os animais sob esta condição apresentam desvantagem significativa no ganho ponderal cerebral quando comparados aos controles, fato que não ocorre com crises convulsivas recorrentes e status epilético.

5. A desnutrição precoce aumenta a relação entre o peso cerebral e o peso corporal dos animais já na fase adulta, em comparação com os animais nutridos.

6. A desnutrição precoce leva a um aumento na suscetibilidade a crises convulsivas recorrentes induzidas por flurothyl em P8, P9 e P10, por diminuir o limiar convulsivo nesses animais. Esse efeito não foi, entretanto, verificado no grupo submetido a status epilético.

7. O enriquecimento ambiental atua, de forma isolada, no peso cerebral aferido nos ratos adultos, independente de terem sofrido desnutrição ou crises convulsivas.

8 PERSPECTIVAS

A linha de pesquisa associando os efeitos da desnutrição e crise convulsiva no cérebro em desenvolvimento é promissora, uma vez que a seqüência de experimentos futuros pode elucidar mais minuciosamente os efeitos desses insultos e testar possíveis tratamentos. Pode-se continuar com esta linha de pesquisa com os objetivos de:

- Incluir, em futuros experimentos, outros métodos de avaliação de memória, além da espacial.

- Incluir, em futuros experimentos, outras formas de reabilitação comportamental.

- Incluir, em futuros experimentos, análise histológica e imuno-histoquímica cerebral.

- Incluir, em futuros experimentos, avaliação da LTP.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aicardi, J. Epileptic syndromes in childhood. Epilepsia, v.29 Suppl 3, p.S1-5. 1988.

Akman, C., Q. Zhao, *et al.* Effect of food deprivation during early development on cognition and neurogenesis in the rat. Epilepsy Behav, v.5, n.4, Aug, p.446-54. 2004.

Albright, T. D., E. R. Kandel, *et al.* Cognitive neuroscience. Curr Opin Neurobiol, v.10, n.5, Oct, p.612-24. 2000.

Almeida, S. S., L. H. Duntas, *et al.* Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. Nutr Neurosci, v.5, n.5, Oct, p.311-20. 2002.

Amaral, O. B., R. S. Vargas, *et al.* Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. Physiol Behav, v.93, n.1-2, Jan 28, p.388-94. 2008.

Amiel-Tison, C., J. Gosselin, *et al.* Head growth and cranial assessment at neurological examination in infancy. Dev Med Child Neurol, v.44, n.9, Sep, p.643-8. 2002.

Andrade, J. P., M. D. Madeira, *et al.* Differential vulnerability of the subiculum and entorhinal cortex of the adult rat to prolonged protein deprivation [abstract]. Hippocampus, v.8, n.1, p.33-47. 1998.

Araki, H., Y. Kobayashi, *et al.* Characteristics of flurothyl-induced seizures and the effect of antiepileptic drugs on flurothyl-induced seizures in Mongolian gerbils. Pharmacol Biochem Behav, v.74, n.1, Dec, p.141-7. 2002.

Austin-Lafrance, R. J., P. J. Morgane, *et al.* Prenatal protein malnutrition and hippocampal function: rapid kindling. Brain Res Bull, v.27, n.6, Dec, p.815-8. 1991.

Baddeley, A. The episodic buffer: a new component of working memory? Trends Cogn Sci, v.4, n.11, Nov 1, p.417-423. 2000.

Bailet, L. L. e W. R. Turk. The impact of childhood epilepsy on neurocognitive and behavioral performance: a prospective longitudinal study. Epilepsia, v.41, n.4, Apr, p.426-31. 2000.

Bedi, K. S. Early-life undernutrition causes deficits in rat dentate gyrus granule cell number. Experientia, v.47, n.10, Oct 15, p.1073-4. 1991.

_____. Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. Physiol Behav, v.51, n.5, May, p.1001-7. 1992.

_____. Undernutrition of rats during early life does not affect the total number of cortical neurons. J Comp Neurol, v.342, n.4, Apr 22, p.596-602. 1994.

- Bedi, K. S., R. F. Massey, *et al.* Neuronal and synaptic measurements in the visual cortex of adult rats after undernutrition during normal or artificial rearing. J Comp Neurol, v.289, n.1, Nov 1, p.89-98. 1989.
- Beghi, M., C. M. Cornaggia, *et al.* Learning disorders in epilepsy. Epilepsia, v.47 Suppl 2, p.14-8. 2006.
- Ben-Ari, Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy [abstract]. Neuroscience, v.14, n.2, Feb, p.375-403. 1985.
- Ben-Ari, Y. e G. L. Holmes. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. Lancet Neurol, v.5, n.12, Dec, p.1055-63. 2006.
- Benetti F, Mello PB, Bonini JS, Monteiro S, Cammarota M, Izquierdo I. Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. Int J Dev Neurosci. 2009;21(1): 59-64.
- Bennett, E. L., M. R. Rosenzweig, *et al.* Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. Science, v.163, n.869, Feb 21, p.825-6. 1969.
- Bliss, T. V. e A. R. Gardner-Medwin. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol, v.232, n.2, Jul, p.357-74. 1973.
- Bliss, T. V. e T. Lomo. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol, v.232, n.2, Jul, p.331-56. 1973.
- Bolduc, F. V. e M. I. Shevell. Corrected head circumference centiles as a possible predictor of developmental performance in high-risk neonatal intensive care unit survivors. Dev Med Child Neurol, v.47, n.11, Nov, p.766-70. 2005.
- Bronzino, J. D., R. J. Austin-Lafrance, *et al.* Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal long-term potentiation in freely moving rats. Exp Neurol, v.148, n.1, Nov, p.317-23. 1997.
- _____. Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. Brain Res, v.515, n.1-2, May 7, p.45-50. 1990.
- _____. Effects of prenatal protein malnutrition on kindling-induced alterations in dentate granule cell excitability. I. Synaptic transmission measures. Exp Neurol, v.112, n.2, May, p.206-15. 1991.
- _____. Effect of protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioral measures [abstract]. Brain Res, v.384, n.2, Oct 8, p.348-54. 1986.
- Brown, J., C. M. Cooper-Kuhn, *et al.* Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. Eur J Neurosci, v.17, n.10, May, p.2042-6. 2003.

Brown, J. L. e E. Pollitt. Malnutrition, poverty and intellectual development. Sci Am, v.274, n.2, Feb, p.38-43. 1996.

Burneo, J. G., J. Tellez-Zenteno, *et al.* Understanding the burden of epilepsy in Latin America: a systematic review of its prevalence and incidence. Epilepsy Res, v.66, n.1-3, Aug-Sep, p.63-74. 2005.

Carughi, A., K. J. Carpenter, *et al.* Effect of environmental enrichment during nutritional rehabilitation on body growth, blood parameters and cerebral cortical development of rats. J Nutr, v.119, n.12, Dec, p.2005-16. 1989.

Cherubini, E., Y. Ben-Ari, *et al.* Anoxia produces smaller changes in synaptic transmission, membrane potential, and input resistance in immature rat hippocampus. J Neurophysiol, v.62, n.4, Oct, p.882-95. 1989.

Cherubini, E., J. L. Gaiarsa, *et al.* GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. Trends Neurosci, v.14, n.12, Dec, p.515-9. 1991.

Cornaggia, C. M., M. Beghi, *et al.* Correlation between cognition and behavior in epilepsy. Epilepsia, v.47 Suppl 2, p.34-9. 2006.

Crnic, L. S. Effects of nutrition and environment on brain biochemistry and behavior [abstract]. Dev Psychobiol, v.16, n.2, Mar, p.129-45. 1983.

Delaney, R. C., A. J. Rosen, *et al.* Memory function in focal epilepsy: a comparison of non-surgical, unilateral temporal lobe and frontal lobe samples [abstract]. Cortex, v.16, n.1, Mar, p.103-17. 1980.

Deupree, D. L., J. Bradley, *et al.* Age-related alterations in potentiation in the CA1 region in F344 rats. Neurobiol Aging, v.14, n.3, May-Jun, p.249-58. 1993.

Dhanushkodi, A. e A. K. Shetty. Is exposure to enriched environment beneficial for functional post-lesional recovery in temporal lobe epilepsy? Neurosci Biobehav Rev, v.32, n.4, p.657-74. 2008.

Dobbing, J., J. W. Hopewell, *et al.* Vulnerability of developing brain. VII. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition [abstract]. Exp Neurol, v.32, n.3, Sep, p.439-47. 1971.

Dobbing, J. e J. Sands. Vulnerability of developing brain not explained by cell number/cell size hypothesis [abstract]. Early Hum Dev, v.5, n.3, Jul, p.227-31. 1981.

Dodrill, C. B. e A. J. Wilensky. Intellectual impairment as an outcome of status epilepticus. Neurology, v.40, n.5 Suppl 2, May, p.23-7. 1990.

Ellenbroek BA, Cools AR. The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background. Neuropsychopharmacology.2000;23(1): 99-106.

Engel, J., Jr. ILAE classification of epilepsy syndromes. Epilepsy Res, v.70 Suppl 1, Aug, p.S5-10. 2006.

Falkenberg, T., A. K. Mohammed, *et al.* Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. Neurosci Lett, v.138, n.1, Apr 13, p.153-6. 1992.

Faverjon, S., D. C. Silveira, *et al.* Beneficial effects of enriched environment following status epilepticus in immature rats. Neurology, v.59, n.9, Nov 12, p.1356-64. 2002.

Fernandes, J. Epidemiology of epileptic syndromes in Porto Alegre: a populational study [thesis]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

Forbes, W. B., W. C. Stern, *et al.* Effect of chronic protein malnutrition on experimentally induced seizures in the rat. Exp Neurol, v.62, n.2, Nov, p.475-81. 1978.

Fukuda, M. T., A. L. Francolin-Silva, *et al.* Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. Behav Brain Res, v.133, n.2, Jul 18, p.271-7. 2002.

_____. Effects of early protein malnutrition and scopolamine on learning and memory in the Morris water maze. Nutr Neurosci, v.10, n.5-6, Oct-Dec, p.251-9. 2007.

Garcia-Ruiz, M., S. Diaz-Cintra, *et al.* Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. Brain Res, v.625, n.2, Oct 22, p.203-12. 1993.

Garcias Da Silva, L. F., M. L. Nunes, *et al.* Risk factors for developing epilepsy after neonatal seizures. Pediatr Neurol, v.30, n.4, Apr, p.271-7. 2004.

Gietzen, D. W., K. D. Dixon, *et al.* Indispensable amino acid deficiency and increased seizure susceptibility in rats. Am J Physiol, v.271, n.1 Pt 2, Jul, p.R18-24. 1996.

Giugliani, E., R. Issler, *et al.* Breastfeeding pattern in a population with different levels of poverty in Southern Brazil. Acta Paediatr, v.85, n.12, Dec, p.1499-500. 1996.

Grantham-Mcgregor, S. A review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development. J Nutr, v.125, n.8 Suppl, Aug, p.2233S-2238S. 1995.

Guardiola, A., C. Egewarth, *et al.* [Evaluation of neuropsychomotor development in first grade children and its relation with nutrition]. J Pediatr (Rio J), v.77, n.3, May-Jun, p.189-96. 2001.

Guerreiro, C. A. M., Guerreiro, M.M., Cendes, F., Lopes-Cendes, I. Epilepsia. São Paulo: Lemos. 2000

Gutierrez, A. C. e E. A. Keller. Analgesic response to stress is reduced in perinatally undernourished rats. J Nutr, v.127, n.5, May, p.765-9. 1997.

Hackett, R. e T. Iype. Malnutrition and childhood epilepsy in developing countries. Seizure, v.10, n.8, Dec, p.554-8. 2001.

Hales, C. N. e D. J. Barker. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia, v.35, n.7, Jul, p.595-601. 1992.

Hashimoto, Y., H. Araki, *et al.* Effects of drugs acting on the GABA-benzodiazepine receptor complex on flurothyl-induced seizures in Mongolian gerbils. Eur J Pharmacol, v.536, n.3, May 1, p.241-7. 2006.

Hemb, M. Efeitos da desnutrição precoce e crises convulsivas na memória espacial do rato imaturo. (Mestrado). Pós Graduação de Clínica Médica Neurociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. 54 p.

Henderson, N. D. Brain weight increases resulting from environmental enrichment: a directional dominance in mice [abstract]. Science, v.169, n.947, Aug 21, p.776-8. 1970.

Hermann, B., J. Jones, *et al.* Children with new-onset epilepsy: neuropsychological status and brain structure. Brain, v.129, n.Pt 10, Oct, p.2609-19. 2006.

Hermann, B. e M. Seidenberg. Epilepsy and cognition. Epilepsy Curr, v.7, n.1, Jan-Feb, p.1-6. 2007.

Hoffmann, A. F., Q. Zhao, *et al.* Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the "two-hit hypothesis". Epilepsy Behav, v.5, n.6, Dec, p.873-7. 2004.

Holmes, G. L. Do seizures cause brain damage? Epilepsia, v.32 Suppl 5, p.S14-28. 1991.

_____. Neonatal seizures. Semin Pediatr Neurol, v.1, n.2, Dec, p.72-82. 1994.

_____. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. Epilepsia, v.38, n.1, Jan, p.12-30. 1997.

_____. Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, v.10, n.2, p.101-5. 2004.

Holmes, G. L., A. Chronopoulos, *et al.* Effects of kindling on subsequent learning, memory, behavior, and seizure susceptibility. Brain Res Dev Brain Res, v.73, n.1, May 21, p.71-7. 1993.

Holmes, G. L., J. L. Gairsa, *et al.* Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects. Ann Neurol, v.44, n.6, Dec, p.845-57. 1998.

Holmes, G. L., R. Khazipov, *et al.* Seizure-induced damage in the developing human: relevance of experimental models. Prog Brain Res, v.135, p.321-34. 2002.

Holmes, G. L., Y. Yang, *et al.* Seizure-induced memory impairment is reduced by choline supplementation before or after status epilepticus. Epilepsy Res, v.48, n.1-2, Jan, p.3-13. 2002.

Huang, L. T., G. L. Holmes, *et al.* Maternal deprivation stress exacerbates cognitive deficits in immature rats with recurrent seizures. Epilepsia, v.43, n.10, Oct, p.1141-8. 2002.

Huang, L. T., M. C. Lai, *et al.* Long-term effects of early-life malnutrition and status epilepticus: assessment by spatial navigation and CREB(Serine-133) phosphorylation. Brain Res Dev Brain Res, v.145, n.2, Nov 12, p.213-8. 2003.

Ip, E. Y., C. C. Giza, *et al.* Effects of enriched environment and fluid percussion injury on dendritic arborization within the cerebral cortex of the developing rat. J Neurotrauma, v.19, n.5, May, p.573-85. 2002.

Iso, H., S. Simoda, *et al.* Environmental change during postnatal development alters behaviour, cognitions and neurogenesis of mice. Behav Brain Res, v.179, n.1, Apr 16, p.90-8. 2007.

Issler, R. M., E. R. Giugliani, *et al.* Poverty levels and children's health status: study of risk factors in an urban population of low socioeconomic level. Rev Saude Publica, v.30, n.6, Dec, p.506-11. 1996.

Ivanovic, D. M., B. P. Leiva, *et al.* Long-term effects of severe undernutrition during the first year of life on brain development and learning in Chilean high-school graduates. Nutrition, v.16, n.11-12, Nov-Dec, p.1056-63. 2000.

_____. Head size and intelligence, learning, nutritional status and brain development. Head, IQ, learning, nutrition and brain. Neuropsychologia, v.42, n.8, p.1118-31. 2004.

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

_____. Questões sobre memória. São Leopoldo: Unisinos. 2004

Izquierdo, I., D. M. Barros, *et al.* Mechanisms for memory types differ. Nature, v.393, n.6686, Jun 18, p.635-6. 1998.

Izquierdo, I. e J. H. Medina. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. Neurobiol Learn Mem, v.68, n.3, Nov, p.285-316. 1997.

Jadavji, N. M., B. Kolb, *et al.* Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats [abstract]. Neuroscience, v.140, n.4, Jul 21, p.1127-38. 2006.

Jankowsky, J. L., T. Melnikova, *et al.* Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease [abstract]. J Neurosci, v.25, n.21, May 25, p.5217-24. 2005.

Jeltsch, H., F. Bertrand, *et al.* Cognitive performances and locomotor activity following dentate granule cell damage in rats: role of lesion extent and type of memory tested. Neurobiol Learn Mem, v.76, n.1, Jul, p.81-105. 2001.

Johansson, B. B. e P. V. Belichenko. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain [abstract]. J Cereb Blood Flow Metab, v.22, n.1, Jan, p.89-96. 2002.

Jordan, T. C., S. E. Cane, *et al.* Deficits in spatial memory performance induced by early undernutrition. Dev Psychobiol, v.14, n.4, Jul, p.317-25. 1981.

Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. Science, v.294, n.5544, Nov 2, p.1030-8. 2001.

Katz, H. B. e C. A. Davies. Effects of differential environments on the cerebral anatomy of rats as a function of previous and subsequent housing conditions [abstract]. Exp Neurol, v.83, n.2, Feb, p.274-87. 1984.

Keller, E. A., L. M. Cancela, *et al.* Lack of adaptive changes in 5-HT sites in perinatally undernourished rats after chronic stress: opioid influence. Pharmacol Biochem Behav, v.47, n.4, Apr, p.789-93. 1994.

Keller, E. A., G. R. Cuadra, *et al.* Perinatal undernutrition affects brain modulatory capacity of beta-adrenergic receptors in adult rats. J Nutr, v.120, n.3, Mar, p.305-8. 1990.

Keller, E. A., V. A. Molina, *et al.* Lack of neuronal adaptive changes following chronic treatments in perinatally undernourished rats. Pharmacol Biochem Behav, v.37, n.4, Dec, p.675-8. 1990.

Kempermann, G. e F. H. Gage. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. Hippocampus, v.9, n.3, p.321-32. 1999.

Kempermann, G., H. G. Kuhn, *et al.* More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature, v.386, n.6624, Apr 3, p.493-5. 1997.

Kinney GG, Wilkinson LO, Saywell KL, Tricklebank MD. Rat strain differences in the ability to disrupt sensorimotor gating are limited to the dopaminergic system, specific to prepulse inhibition, and unrelated to changes in startle amplitude or nucleus accumbens dopamine receptor sensitivity. J Neurosci. 1999; 19(13): 5644-53.

Koh, S., H. Chung, *et al.* Environmental enrichment reverses the impaired exploratory behavior and altered gene expression induced by early-life seizures. J Child Neurol, v.20, n.10, Oct, p.796-802. 2005.

Kolb, B. e I. Q. Whishaw. Brain plasticity and behavior. Annu Rev Psychol, v.49, p.43-64. 1998.

Komitova, M., B. Mattsson, *et al.* Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats [abstract]. Stroke, v.36, n.6, Jun, p.1278-82. 2005.

Lado, F. A., E. C. Laureta, *et al.* Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. Epileptic Disord, v.4, n.2, Jun, p.83-97. 2002.

Leuba, G. e T. Rabinowicz. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. I. Cellular densities, cortical volume and total numbers of cells [abstract]. Exp Brain Res, v.37, n.2, Oct, p.283-98. 1979a.

_____. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. II. Evolution of dendritic branchings and spines in the visual region [abstract]. Exp Brain Res, v.37, n.2, Oct, p.299-308. 1979b.

Levitsky, D. A. e R. H. Barnes. Nutritional and environmental interactions in the behavioral development of the rat: long-term effects [abstract]. Science, v.176, n.30, Apr 7, p.68-71. 1972.

Levitsky, D. A. e B. J. Strupp. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. J Nutr, v.125, n.8 Suppl, Aug, p.2212S-2220S. 1995.

Liu, R. S., L. Lemieux, *et al.* Cerebral damage in epilepsy: a population-based longitudinal quantitative MRI study. Epilepsia, v.46, n.9, Sep, p.1482-94. 2005.

Liu, X., R. U. Muller, *et al.* Seizure-induced changes in place cell physiology: relationship to spatial memory. J Neurosci, v.23, n.37, Dec 17, p.11505-15. 2003.

Liu, Z., C. E. Stafstrom, *et al.* Age-dependent effects of glutamate toxicity in the hippocampus. Brain Res Dev Brain Res, v.97, n.2, Dec 23, p.178-84. 1996.

Liu, Z., Y. Yang, *et al.* Consequences of recurrent seizures during early brain development. Neuroscience, v.92, n.4, p.1443-54. 1999.

Llorent R, Gallardo ML, Berzal AL, Prada C, Garcia-Segura LM, Viveros MP. Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. Int J Dev Neurosci. 2009; 27(3): 233-41.

Lombroso, C. T. Prognosis in neonatal seizures [abstract]. Adv Neurol, v.34, p.101-13. 1983.

_____. Neonatal seizures: a clinician's overview. Brain Dev, v.18, n.1, Jan-Feb, p.1-28. 1996a.

_____. Neonatal seizures: historic note and present controversies. Epilepsia, v.37 Suppl 3, p.5-13. 1996b.

Lores-Arnaiz, S., J. Bustamante, *et al.* Extensive enriched environments protect old rats from the aging dependent impairment of spatial cognition, synaptic plasticity and nitric oxide production. Behav Brain Res, v.169, n.2, May 15, p.294-302. 2006.

_____. Exposure to enriched environments increases brain nitric oxide synthase and improves cognitive performance in prepubertal but not in young rats. Behav Brain Res, v.184, n.2, Dec 3, p.117-23. 2007.

Lukoyanov, N. V. e J. P. Andrade. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. Behav Brain Res, v.112, n.1-2, Jul, p.85-97. 2000.

Lüps, P. "Haller's law" (1762): The observation of a relation between brain weight and body weight by Albrecht von Haller (1708-1777) [in press]. Mammalian Biology. 2009.

Lynch, M., U. Sayin, *et al.* Long-term consequences of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity. Eur J Neurosci, v.12, n.7, Jul, p.2252-64. 2000.

Marks, J. D., J. E. Friedman, *et al.* Vulnerability of CA1 neurons to glutamate is developmentally regulated. Brain Res Dev Brain Res, v.97, n.2, Dec 23, p.194-206. 1996.

Martinez-Cue, C., C. Baamonde, *et al.* Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. Behav Brain Res, v.134, n.1-2, Aug 21, p.185-200. 2002.

Mccabe, B. K., D. C. Silveira, *et al.* Reduced neurogenesis after neonatal seizures. J Neurosci, v.21, n.6, Mar 15, p.2094-103. 2001.

Mello, E. Recuperação do desnutrido. In: Artmed (Ed.). Ferreira JS. Pediatria: Diagnóstico e tratamento. Porto Alegre, v.1, 2005. Recuperação do desnutrido., p.141-146

Millan, M. H., A. G. Chapman, *et al.* Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. Epilepsy Res, v.14, n.2, Feb, p.139-48. 1993.

Molina, V. A., E. A. Keller, *et al.* Reduced anti-immobility effect of repeated desipramine (DMI) treatment in adult rats undernourished at perinatal age. Pharmacol Biochem Behav, v.26, n.2, Feb, p.417-9. 1987.

Moore, C. I., M. D. Browning, *et al.* Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged Fischer 344 rats. Hippocampus, v.3, n.1, Jan, p.57-66. 1993.

Morgane, P. J., R. Austin-Lafrance, *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. Neurosci Biobehav Rev, v.17, n.1, Spring, p.91-128. 1993.

Morgane, P. J., D. J. Mokler, *et al.* Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. Neurosci Biobehav Rev, v.26, n.4, Jun, p.471-83. 2002.

Morris, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods, v.11, n.1, May, p.47-60. 1984.

Moshe, S. L. e B. J. Albala. Maturation changes in postictal refractoriness and seizure susceptibility in developing rats. Ann Neurol, v.13, n.5, May, p.552-7. 1983.

Muller, O. e M. Krawinkel. Malnutrition and health in developing countries. Cmaj, v.173, n.3, Aug 2, p.279-86. 2005.

- Nairismagi, J., A. Pitkanen, *et al.* Status epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: a histologic and MRI study. Epilepsia, v.47, n.3, Mar, p.479-88. 2006.
- Nakamura, H., S. Kobayashi, *et al.* Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. J Neurosci Res, v.56, n.3, May 1, p.307-15. 1999.
- Nithianantharajah, J. e A. J. Hannan. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. Nat Rev Neurosci, v.7, n.9, Sep, p.697-709. 2006.
- Nunes, M. L. [Malnutrition and neuropsychomotor development]. J Pediatr (Rio J), v.77, n.3, May-Jun, p.159-60. 2001.
- Nunes, M. L., B. B. Batista, *et al.* [Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats]. J Pediatr (Rio J), v.78, n.1, Jan-Feb, p.39-44. 2002.
- Nunes, M. L., S. Liptakova, *et al.* Malnutrition increases dentate granule cell proliferation in immature rats after status epilepticus. Epilepsia, v.41 Suppl 6, p.S48-52. 2000.
- Ogura, A. e O. A. Orsingher. Effect of early malnutrition on hippocampal seizure threshold in rats [abstract]. Behav Neural Biol, v.28, n.1, Jan, p.105-10. 1980.
- Oitzl MS, Workel JO, Flutterm M, Frosch F, De Kloet ER. Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent Brown Norway rats. Eur J Neurosci.2000; 12(10): 3771-80.
- Palencia, G., M. Calvillo, *et al.* Chronic malnutrition caused by a corn-based diet lowers the threshold for pentylenetetrazol-induced seizures in rats. Epilepsia, v.37, n.6, Jun, p.583-6. 1996.
- Pinaud, R., M. R. Penner, *et al.* Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment: implications for molecular plasticity. Brain Res Mol Brain Res, v.91, n.1-2, Jul 13, p.50-6. 2001.
- Reid, I. C. e C. A. Stewart. Seizures, memory and synaptic plasticity. Seizure, v.6, n.5, Oct, p.351-9. 1997.
- Rice, A. C., C. L. Floyd, *et al.* Status epilepticus causes long-term NMDA receptor-dependent behavioral changes and cognitive deficits. Epilepsia, v.39, n.11, Nov, p.1148-57. 1998.
- Risedal, A., B. Mattsson, *et al.* Environmental influences on functional outcome after a cortical infarct in the rat. Brain Res Bull, v.58, n.3, Jul, p.315-21. 2002.
- Riviello, P., I. De Rogalski Landrot, *et al.* Lack of cell loss following recurrent neonatal seizures. Brain Res Dev Brain Res, v.135, n.1-2, Apr 30, p.101-4. 2002.
- Rodier, P. M. Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications [abstract]. Dev Med Child Neurol, v.22, n.4, Aug, p.525-45. 1980.

Rogan, M. T. e J. E. Ledoux. LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory-evoked responses in a fear conditioning circuit. Neuron, v.15, n.1, Jul, p.127-36. 1995.

Rosenzweig, M. R. e E. L. Bennett. Cerebral changes in rats exposed individually to an enriched environment [abstract]. J Comp Physiol Psychol, v.80, n.2, Aug, p.304-13. 1972.

_____. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. Behav Brain Res, v.78, n.1, Jun, p.57-65. 1996.

Rosenzweig, M. R., D. Krech, *et al.* Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension [citation]. J Comp Physiol Psychol, v.55, Aug, p.429-37. 1962.

Rots NY, de Jong J, Workel JO, Levine S, Cools AR, De Kloet ER. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. J Neuroendocrinol. 1996;8(7):501-6

Royland, J., P. Klinkhachorn, *et al.* How much undernourishment is required to retard brain myelin development. Neurochem Int, v.21, n.2, Sep, p.269-74. 1992.

Ruedi-Bettschen D, Pedersen E M, Feldon J, Pryce CR. Early deprivation under specific conditions leads to reduced interest in reward in adulthood in Wistar rats. Behav Brain Res.2005;156(2): 297-310

Rutten, A., M. Van Albada, *et al.* Memory impairment following status epilepticus in immature rats: time-course and environmental effects. Eur J Neurosci, v.16, n.3, Aug, p.501-13. 2002.

Sankar, R., D. H. Shin, *et al.* Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. J Neurosci, v.18, n.20, Oct 15, p.8382-93. 1998.

Sarkar, C., Roy,S., Gopinath,G. Effect of neonatal undernutrition on the brain [abstract]. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. Part B, Biol. Sci., n.56, p.29-36. 1990.

Scher, M. S. Neonatal seizures and brain damage. Pediatr Neurol, v.29, n.5, Nov, p.381-90. 2003.

Sharma, S. K., M. Behari, *et al.* Seizure susceptibility & intra rectal sodium valproate induced recovery in developing undernourished rats. Indian J Med Res, v.92, Apr, p.120-7. 1990.

Sharma, S. K., W. Selvamurthy, *et al.* Kainic acid induced epileptogenesis in developing normal & undernourished rats--a computerised EEG analysis. Indian J Med Res, v.92, Dec, p.456-66. 1990.

Shinnar, S., J. M. Pellock, *et al.* In whom does status epilepticus occur: age-related differences in children. Epilepsia, v.38, n.8, Aug, p.907-14. 1997.

Stafstrom, C. E. Assessing the behavioral and cognitive effects of seizures on the developing brain. Prog Brain Res, v.135, p.377-90. 2002.

Stafstrom, C. E., A. Chronopoulos, *et al.* Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures. Epilepsia, v.34, n.3, May-Jun, p.420-32. 1993.

Stam, N. C., J. Nithianantharajah, *et al.* Sex-specific behavioural effects of environmental enrichment in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [abstract]. Eur J Neurosci, v.28, n.4, Aug, p.717-23. 2008.

Stern, W. C., W. B. Forbes, *et al.* Seizure susceptibility and brain amine levels following protein malnutrition during development in the rat [abstract]. Brain Res, v.79, n.3, Oct 25, p.375-84. 1974.

Stoch, M. B., P. M. Smythe, *et al.* Psychosocial outcome and CT findings after gross undernourishment during infancy: a 20-year developmental study [abstract]. Dev Med Child Neurol, v.24, n.4, Aug, p.419-36. 1982.

Strauss, E., D. Loring, *et al.* Predicting cognitive impairment in epilepsy: findings from the Bozeman epilepsy consortium. J Clin Exp Neuropsychol, v.17, n.6, Dec, p.909-17. 1995.

Tourinho, H. Desnutrição na infância. In: S. M. Duncan Bb, Giugliani E (Ed.). Medicina Ambulatorial. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992. Desnutrição na infância., p.85-91

Van Dellen, A., C. Blakemore, *et al.* Delaying the onset of Huntington's in mice [abstract]. Nature, v.404, n.6779, Apr 13, p.721-2. 2000.

Van Praag, H., G. Kempermann, *et al.* Neural consequences of environmental enrichment. Nat Rev Neurosci, v.1, n.3, Dec, p.191-8. 2000.

Varty GB, Geyer MA. Effects of isolation rearing on startle reactivity, habituation, and prepulse inhibition in male Lewis, Sprague-Dawley, and Fischer F344 rats [abstract]. Behav Neurosci. 1998;112(6): 1450-7.

Veena, J., B. N. Srikumar, *et al.* Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. Neurosci Lett, v.455, n.3, May 22, p.178-82. 2009.

Wang, C. A., M. C. Lai, *et al.* An enriched environment improves cognitive performance after early-life status epilepticus accompanied by an increase in phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2. Epilepsy Behav, v.11, n.3, Nov, p.303-9. 2007.

Warren, M. A. e K. S. Bedi. A quantitative assessment of the development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats [abstract]. J Comp Neurol, v.227, n.1, Jul 20, p.104-8. 1984.

Wasterlain, C. G. Effects of neonatal status epilepticus on rat brain development [abstract]. Neurology, v.26, n.10, Oct, p.975-86. 1976.

Watson, J. S. e P. J. Livesey. Malnutrition and group brain- and body-weight variability: data in search of a hypothesis [abstract]. Med Hypotheses, v.14, n.4, Aug, p.357-61. 1984.

White, H. S. Animal models of epileptogenesis. Neurology, v.59, n.9 Suppl 5, Nov 12, p.S7-S14. 2002.

Who. Epilepsy:aetiology,epidemiology and prognosis (revised Feb. 2001). W. F. S. 1-4. 2008 2001.

_____. Global Database in child growth and malnutrition. 2008 2005.

Wiggins, R. C., G. Fuller, *et al.* Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. Life Sci, v.35, n.21, Nov 19, p.2085-94. 1984.

Will, B., R. Galani, *et al.* Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). Prog Neurobiol, v.72, n.3, Feb, p.167-82. 2004.

Winick, M. Malnutrition and brain development [abstract]. J Pediatr, v.74, n.5, May, p.667-79. 1969.

Winick, M. e P. Rosso. Head circumference and cellular growth of the brain in normal and marasmic children [abstract]. J Pediatr, v.74, n.5, May, p.774-8. 1969.

Xu, X., L. Ye, *et al.* Environmental enrichment induces synaptic structural modification after transient focal cerebral ischemia in rats. Exp Biol Med (Maywood), v.234, n.3, Mar, p.296-305. 2009.

Yang, Y., P. Tandon, *et al.* Synaptic reorganization following kainic acid-induced seizures during development. Brain Res Dev Brain Res, v.107, n.2, May 15, p.169-77. 1998.

Young, D., P. A. Lawlor, *et al.* Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. Nat Med, v.5, n.4, Apr, p.448-53. 1999.

Zhang LX, Levine S, Dent G, Zhan Y, Xing G, Okimoto D et al. Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. Brain Res Dev Brain Res. 2002;133(1): 1-11.

10 ANEXOS

Anexo A. Email de aceitação do corpo editorial da Revista Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology

Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology
Revista de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica
Órgão Oficial da Liga Brasileira de Epilepsia

Porto Alegre, 11 de fevereiro de 2010.

Prezada Dra. Juliana Porto,

Comunicamos que o seu artigo "*Efeitos da Epilepsia e da Desnutrição no Sistema Nervoso Central em Desenvolvimento: Aspectos Clínicos e Evidências Experimentais*", foi encaminhado para submissão do Corpo Editorial do Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology (JECN).

Atenciosamente,

Nurma R. Pereira

Secretária do JECN

jecnpoa@terra.com.br

Anexo B. Artigo enviado para a Revista Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology

**Efeitos da Epilepsia e da Desnutrição no Sistema Nervoso Central em Desenvolvimento:
aspectos clínicos e evidências experimentais**

Juliana Antola Porto¹

Ana Gaudio de Oliveira²

Andréa Largura²

Tomás Schmitt Adam²

Magda Lahorgue Nunes³

¹ Médica neuropediatra. Mestranda do Programa de Neurociências, Clínica Médica, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

² Acadêmicos da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

³ Professora Adjunta de Neurologia da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Serviço de Neurologia do Hospital São Lucas da PUCRS e Laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS

Autor correspondente:

Dra. Magda Lahorgue Nunes

Serviço de Neurologia do HSL PUCRS

Av. Ipiranga 6690 sala 220, 90610-000 Porto Alegre, RS.

Fone/Fax: 51 33394936

E-mail: nunes@pucrs.br

RESUMO

Introdução: A desnutrição e epilepsia são problemas prevalentes em países em desenvolvimento, principalmente na faixa etária pediátrica.

Objetivos: Tendo em vista o impacto que insultos como as crises convulsivas e a desnutrição geram no sistema nervoso central (SNC) de crianças, nosso estudo visa revisar a literatura atual sobre a relação entre desnutrição precoce e epilepsia estudos clínicos e experimentais com ratos

Metodologia: Revisão de literatura em revistas indexadas no Medline, no período de janeiro de 2000 até dezembro de 2008.

Resultados: Foram utilizados os unitermos *epilepsy* e *malnutrition* para a busca, sendo encontrados 1044 artigos, dos quais 56 foram selecionados para esta revisão.

Procuramos resumir os principais achados referentes às alterações influenciadas pelas crises convulsivas e desnutrição no desenvolvimento do SNC.

Conclusões: A análise desses artigos indicou que a desnutrição precoce acarreta déficit neuronal, com alterações cognitivas e modificações no desenvolvimento e crescimento em modelos experimentais, podendo haver maior suscetibilidade a crises convulsivas.

Aparentemente, a desnutrição não é uma causa direta de epilepsia, mas pode diminuir o limiar para as crises epiléticas, havendo um efeito aditivo entre ambas.

PALAVRAS –CHAVE: epilepsia, desnutrição, limiar para convulsões, cérebro em desenvolvimento.

ABSTRACT

Introduction: Malnutrition and epilepsy are main problems in developing countries, especially in early ages.

Purpose: Considering the impact that insults like seizures and malnutrition have in the developing central nervous system (CNS), our study intends to review the current literature about the relation between epilepsy and early malnutrition in clinical and experimental studies with rats.

Methods: Literature review in Medline, during the period of January of 2000 to December 2008.

Results: Using the key words *epilepsy* and *malnutrition*, 1044 articles were found, from which we used 56 for this review. We intended to summarize the main findings that are referred to the alterations induced by seizures and malnutrition in the CNS development.

Conclusion: The analysis of these articles indicated that early malnutrition lead to neuronal deficit, with cognitive alterations and growth and developmental disorders in experimental models, possibly causing more susceptibility to seizures. Apparently, malnutrition is not a direct cause of epilepsy, but it can decrease the threshold to seizures, suggesting an additive effect between these variables.

KEY WORDS: epilepsy, malnutrition, seizure threshold, developing brain.

INTRODUÇÃO:

A epilepsia e a desnutrição são importantes problemas de saúde pública em diversos países em desenvolvimento com implicações econômicas, médicas e socioculturais.

A desnutrição materno-infantil é uma das principais causas responsáveis pelo alto índice de mortalidade infantil ainda registrado nos países em desenvolvimento. As crianças desnutridas apresentam deficiências no seu sistema imunológico e maior risco de infecções, além de maior predisposição ao atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (28,53).

A desnutrição é um problema mundial que afeta recém-nascidos e crianças durante os estágios mais vulneráveis do desenvolvimento cerebral, alterando eventos de maturação cerebral e conduzindo a alterações comportamentais, alterações nas funções cognitivas e distúrbios no aprendizado e na memória (36).

Uma das mais prevalentes desordens cerebrais em países subdesenvolvidos é a epilepsia. Estima-se que 80% da população que sofre de epilepsia no mundo residam em países em desenvolvimento (20). Essa estimativa é de suma importância, visto que as comorbidades psiquiátricas e comportamentais afetam aproximadamente 40 a 50% das crianças e adolescentes com epilepsia (47). Algumas comorbidades são compartilhadas por adultos e crianças, como depressão e ansiedade. Outras, entretanto, aparecem especificamente na infância, como autismo, transtornos de aprendizagem e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (76).

Existem evidências de que crianças nascidas em países em desenvolvimento são expostas a uma maior taxa de eventos que podem causar epilepsia, como infecção do SNC, e a um maior número de complicações pré-natais e perinatais (9,25). Entre as neuroinfecções a cisticercose é a parasitose cerebral mais frequente, sendo bastante prevalente em países pobres onde as condições sanitárias são precárias (8,37). A convulsão febril também é outra condição

prevalente na infância (5,30). Tais exemplos suportam a idéia de que inúmeras patologias que levam a epilepsia são freqüentemente preveníveis.

Desnutrição e epilepsia são, portanto, problemas prevalentes em países em desenvolvimento, sendo uma relação causa-efeito sugerida em estudos em modelo animal (12, 13, 27, 41,51). Até o presente momento nenhum estudo clínico demonstrou que a desnutrição aumente o risco de epilepsia, entretanto, em alguns estudos, observou-se uma tendência a maior incidência de epilepsia em crianças desnutridas (40). Além disso, é conhecido que a desnutrição diminui o limiar de indução das crises convulsivas (12, 13, 27, 41,51).

A desnutrição durante o desenvolvimento cerebral pode resultar em vários distúrbios anatômicos e bioquímicos. A desnutrição *per se* aumenta a neurogênese hipocampal (44). A associação da desnutrição com as crises convulsivas pode aumentar os efeitos deletérios das crises no cérebro em desenvolvimento (39).

Considerando a importância epidemiológica da desnutrição e da epilepsia nos aspectos cognitivos e maturacionais do SNC, esse trabalho proporciona uma revisão sobre a interação desses dois fatores.

Efeitos da desnutrição no SNC em desenvolvimento

A desnutrição protéica pré-natal não necessariamente resulta em anormalidades anatômicas cerebrais, como alterações patológicas focais ou lesões a nível celular. Sabe-se, ademais, que isoladamente a desnutrição não causa patologias graves como retardo mental. Viu-se, outrossim, a ocorrência de alterações no desenvolvimento comportamental e intelectual em níveis inferiores aos esperados para a idade em indivíduos subnutridos (50). Os efeitos do insulto decorrente do déficit nutricional são duradouros e levam a déficits permanentes no aprendizado e na memória (26 50,54).

Diversos distúrbios eletrolíticos foram identificados em crianças que apresentam desnutrição protéica. Além da deficiência dietética, infecções, principalmente diarreia e parasitoses, comprometem a nutrição induzindo má absorção e aumento da demanda metabólica para formar uma resposta imune apropriada. Estudos também identificaram concentrações reduzidas de albumina e de proteínas plasmáticas, hipocalcemia, hiponatremia (23), hipomagnesemia (3,16) e hipocalcemia (4). Muitos dos distúrbios eletrolíticos característicos da desnutrição severa podem diminuir o limiar das crises, por exemplo, a hiponatremia (33) e a hipocalcemia (15). Crises epiléticas também foram observadas em crianças desnutridas com hipomagnesemia (16), que rapidamente responderam à administração de magnésio. Uma maior incidência de crises também foi observada em crianças desnutridas hipoglicêmicas (11).

Foram identificadas alterações nos níveis de neurotransmissores excitatórios (glutamato) e inibitórios (GABA) em crianças desnutridas. Níveis reduzidos de GABA foram encontrados no líquido e no córtex cerebral de pacientes com epilepsia (55). Os níveis desses neurotransmissores podem ser afetados pela ingestão diminuída de aminoácidos e de seus precursores ou pela depleção de neurônios gabaérgicos no hipocampo e giro denteado induzida pela desnutrição (2).

Estudos recentes indicam que diversos insultos, incluindo a desnutrição, interrompem a normalidade do desenvolvimento e da função hipocampal, através aumento da inibição, resultando em limitações da plasticidade do hipocampo. Isso ocorre tanto pelas ações diretas na formação do hipocampo (principalmente nos interneurônios gabaérgicos) ou indiretamente, afetando os receptores de entrada subcortical para a formação do hipocampo (6, 7, 35,52). Uma propriedade especialmente importante do circuito hipocampal é que a eficácia e a força sináptica podem ser aumentadas ou diminuídas através da ativação repetida de entradas aferentes. A normalidade da formação do hipocampo pode ser verificada em estudos de

plasticidade sináptica e da formação de processos de memória. Acredita-se que esses dois fenômenos são alterados por insultos pré-natais como a desnutrição (36). A desnutrição diminui a plasticidade neurofisiológica, o que pode ser um mecanismo crítico na maturação cerebral levando a futuros déficits de aprendizado.

Verificou-se, ademais, que possível associação entre a diminuição da imunidade causada pela desnutrição e a conseqüente diminuição da resistência a infecções, poderia tornar estas crianças mais vulneráveis a infecções por vírus neurotrópicos, potencialmente causadores de epilepsia (17).

Estudos experimentais evidenciam que a desnutrição perinatal causa alterações permanentes, fisiológicas e morfológicas no SNC em desenvolvimento, além de diminuir o limiar para crises convulsivas (12, 13, 27, 41,51). Os efeitos da desnutrição intrauterina são particularmente graves no período de proliferação e crescimento neuronal, sendo enfatizada a susceptibilidade de determinadas estruturas do SNC, como córtex, hipocampo e cerebelo (21,22).

Efeitos das crises convulsivas e da epilepsia sobre o SNC em desenvolvimento

As crianças são mais suscetíveis a crises epiléticas durante os primeiros meses de vida (10,25), primeiro pelas possíveis intercorrências da gestação e do período neonatal (i.e. asfixia perinatal, infecções perinatais, distúrbios metabólicos, hemorragia intracraniana) e também pelo fato do cérebro imaturo ser mais suscetível às crises que o cérebro maduro. As crises convulsivas febris são um importante exemplo da maior susceptibilidade às crises do cérebro imaturo. A febre, que em adultos raramente resulta em crises epiléticas, acarreta crises em 1 a 14% das crianças, constituindo o tipo mais comum de crise convulsiva na infância (10,29).

A propensão a crises convulsivas no sistema nervoso central em desenvolvimento tem sido evidenciada em diversos modelos experimentais. As bases dos mecanismos responsáveis por aumentar a excitabilidade não são completamente conhecidas, mas são idade-dependentes. Neurônios e redes imaturas tendem a gerar descargas periódicas, o que facilita a criação de oscilações patológicas e potencialmente patogênicas. Essa tendência dos neurônios imaturos à oscilação é devido à sua alta resistência, que auxilia na geração de potenciais de ação e aumenta a excitabilidade (31,32).

Um estudo que fez a aplicação do paradigma da desnutrição (limitação da lactação através da separação da fêmea nutriz de parte da ninhada por períodos crescentes de tempo de até o décimo quinto dia de vida) evidenciou a partir do quinto dia uma diferença estatisticamente significativa entre o peso corporal dos desnutridos em comparação com os nutridos. O processo de reabilitação nutricional iniciado no 16^o dia foi associado a uma curva ascendente de ganho de peso, mas a diferença estatisticamente significativa entre os grupos permaneceu até o trigésimo dia. Nessa mesma pesquisa, os animais foram submetidos a crises convulsivas induzidas por flurothyl. O limiar para o início da primeira crise foi avaliado no 15^o e 30^o dia. Não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos, entretanto foi observado que os animais nutridos no 15^o dia apresentavam um limiar maior para o desenvolvimento das crises convulsivas clônicas e tônico-clônicas em comparação aos desnutridos. Tendência inversa foi observada no 30^o dia, quando os animais desnutridos apresentaram um limiar maior para ambos os tipos de crises convulsivas (38).

Outro estudo experimental que induziu crises epiléticas em ratos nutridos e desnutridos evidenciou que a suscetibilidade às crises dos desnutridos não foi afetada em comparação aos nutridos. O estado epilético induzido por flurothyl nos ratos estimulou, no entanto, o surgimento de novas células no giro denteado anterior (39). O significado do aparecimento dessas células após as crises não é claro. Foi sugerido que a plasticidade da rede hipocampal

associado a epileptogênese pode surgir de conexões aberrantes formadas pelas células recém-nascidas (43,44). Este estudo observou que apesar da desnutrição aumentar a expressão dessas células, isso não alterou a suscetibilidade às crises (39). Os dados deste estudo sugerem, dessa forma, que a desnutrição induz neurogênese hipocampal. Além disso, o estado de mal convulsivo também aumenta a taxa de surgimento de novas células nessa área, ou seja, aparentemente desnutrição e status epilético têm efeitos aditivos (39).

Estudos que avaliam o efeito da desnutrição e da epilepsia no cérebro em desenvolvimento

O efeito da desnutrição no limiar para crises convulsivas parece ser uma questão idade e modelo dependente. Animais que sofreram desnutrição intrauterina ou na fase de lactação submetida a crises na idade adulta apresentam maior suscetibilidade ao desenvolvimento de convulsões (38). A revisão de diversos estudos evidenciou alterações cognitivas, comportamentais e no desenvolvimento de ratos, em estudos experimentais, baseados no método da desnutrição e indução de crises convulsivas (Tabela 1).

A desnutrição crônica tem efeitos deletérios no sistema nervoso central. O dano cerebral induzido pela desnutrição em experimentos é relacionado à duração da desnutrição, às características dietéticas e ao estágio do desenvolvimento cerebral em que a desnutrição ocorre. Apesar disso, pesquisadores concordam que as alterações cerebrais induzidas pela maioria das formas de desnutrição são geralmente permanentes ou há muita dificuldade para reverter os danos completamente (1, 18, 19,42).

A desnutrição diminui a plasticidade cerebral, podendo ser um dos mecanismos que leva a déficits de aprendizado e prejuízo cognitivo, como consequência de um insulto ao cérebro em desenvolvimento. A plasticidade contribui para o impacto dos desequilíbrios nutricionais no

desenvolvimento cerebral, principalmente a plasticidade restaurada que ocorre como resultado da reabilitação nutricional (45). Consideráveis evidências indicam que sinapses nos cérebros desnutridos são menos capazes de organizar a plasticidade. A diminuição da plasticidade é um dos resultados do aumento da inibição, considerado o mecanismo fisiopatológico primário na formação do hipocampo associado à desnutrição (14 34,35).

É importante o fato de que uma falha no desenvolvimento devido a um insulto nutricional não necessariamente conduz a uma disfunção cerebral imediata. As conseqüências de uma limitação nutricional durante um estágio do desenvolvimento cerebral podem permanecer latentes, sendo apenas fatores de predisposição até o momento em que o indivíduo é submetido a circunstâncias ambientais estressoras (36).

Diversos estudos sugerem que deficiências dietéticas, comuns em humanos sujeitos à desnutrição crônica, exercem um dano no cérebro que o deixa mais vulnerável às crises epiléticas (41). Assim, a desnutrição não é uma causa direta de epilepsia, mas possui papel importante por diminuir o limiar para as crises epiléticas (24,49). Experimentalmente, a reabilitação nutricional iniciada precocemente parece gerar um efeito protetor à susceptibilidade dos animais a crises convulsivas.

As alterações encontradas nos níveis de neurotransmissores inibitórios nos levam a crer que o GABA tenha um papel na prevenção da distribuição da crise e não na origem da crise (48 55,56). Logo, a deficiência de nutrientes, como a de aminoácidos indispensáveis, ativa o córtex piriforme anterior, uma estrutura límbica bastante suscetível a crises em ratos, diminuindo o limiar convulsivo e aumentando a severidade das crises.

Algumas descobertas sugerem que a desnutrição precoce altera a plasticidade, mas não a susceptibilidade às crises induzidas por flurothyl. Embora o estado de mal convulsivo possa aumentar a expressão de novas células no giro denteado nos ratos imaturos, a desnutrição seguida do estado epilético aumenta a proliferação celular do giro denteado. Parece que a

desnutrição e o estado epiléptico têm efeitos aditivos. O significado desses achados ainda não é claro, mas supõe-se que as mudanças plásticas associadas a neurogênese possam causar um aumento da epileptogênese.

CONCLUSÕES:

Separadamente, vemos inúmeras alterações causadas pela epilepsia e pela desnutrição no SNC. Existem poucos estudos, entretanto, que tentam elucidar os efeitos da possível interação entre desnutrição e epilepsia. Sendo estas condições prevalentes em nosso meio, faz-se necessário uma maior exploração dessas patologias e suas conseqüências, tanto a nível bioquímico e celular, quanto a potenciais alterações cognitivas posteriores. Ademais, é também necessário que se busquem formas de intervir na tentativa de minimizar ou anular os efeitos gerados pela desnutrição e pela epilepsia no cérebro em desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS:

Ana Gaudio de Oliveira foi bolsista de iniciação científica da FAPERGS.

Andréa Largura e Tomás Schmitt Adam foram bolsistas de iniciação científica do CNPq.

Juliana Antola Porto é bolsista de pós-graduação pela CAPES.

Magda Lahorgue Nunes é bolsista de Produtividade Científica pelo CNPq.

TABELA 1 – Estudos de efeitos da desnutrição e epilepsia no SNC.

Estudo	Paradigma desnutrição	Modelo de crises	Idade animal	Resultados
Nunes et al. (39)	Privação da alimentação por afastamento do rato da fêmea nutriz por períodos crescentes de 2h (iniciando em P2) até 12h. A privação permanecia até P17.	Crises induzidas por inalação de flurothyl	Desnutrição p2 a p17 Crises em p15 Histologia em p18	Diferença significativa no peso cerebral e corporal. Tendência a menor limiar para crises nos desnutridos. Neurogênese no giro dentado anterior
Bronzino et al. (13)	Desnutrição pré-natal onde as fêmeas recebiam uma dieta pobre em proteína.	Crises induzidas através de diversos impulsos elétricos subconvulsivos.	Testados em P90 (adultos)	Má nutrição das fêmeas levou a um menor limiar excitatório necessário para o desenvolvimento de crises.
Andrade et al. (2)	1/3 dos animais submetidos à dieta hipoprotéica por 12 meses, 1/3 com dieta hipoprotéica por 6 meses e 6 meses com dieta normal, 1/3 grupo controle.	Não foram utilizados protocolos para indução de crises convulsivas neste estudo.	P60	Má nutrição leva a redução reversível da inervação colinérgica na formação hipocampal e a diminuição irreversível no número de neurônios colinérgicos e gabaérgicos.
Palencia et al. (41)	Uso de dieta hipoprotéica	Crises induzidas através da administração de pentylenetetrazol.	P60	Redução do limiar para crises e atrofia neuronal principalmente no hipocampo e córtex cerebral.
Morgane et al. (36).	Desnutrição pré-natal com dieta pobre em caseína	Não foi realizada indução de crises convulsivas		Déficit no número de células neuronais.

REFERÊNCIAS:

1. Ahmed MGE, Bedi KS, Warren MA, Kame1 MM. Effects of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse: granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 1987 Sep 1; 263(1): 146-58.
2. Andrade, J. P. and Paula-Barbosa, M. M. Protein malnutrition alters the cholinergic and GABAergic systems of the hippocampal formation of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neuroscience Letters* 1996; 211: 211–215.
3. Anonymous, Magnesium and Malnutrition. *Lancet* 1967; 1: 712–713.
4. Antener, I., Verwilghen, A. M., Van Geert, C. *et al.* Study of malnutrition III. Biochemical assessment of the dietary treatment and evolution of the illness. *Helvetica Paediatrica Acta* 1978; 33: 543–562.
5. Asindi, A.A., Antia-Obong, O.E., Ibia, E.O., Udo, J.J. Neonatal seizures in Nigerian infants. *Far. J. Med. Sci.* 1995; 24: 243- 248.
6. Austin KB, Beiswanger C, Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Galler JR, Morgane PJ. Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus. *Brain Res Bull* 1992; 28: 245–55.
7. Austin KB, Bronzino JD, Morgane PJ. Paired-pulse facilitation and inhibition in the dentate gyrus is dependent on behavioral state. *Exp Brain Res* 1989; 77: 594–604.
8. Avode, D.G., Bouteille, B., Houngbe, F., Adjien, C., Adjide, C., Houinato, D., Hountondji, A., Dumas, M. Epilepsy, cysticercosis and neurocysticercosis in Benin. *Eur. Neurol.* 1998; 39: 60-61.
9. Bale, J. F. Viral encephalitis. *Medical Clinics of North America* 1993; 77: 25–42
10. Ben-Ari Y, Holmes GL. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol* 2006; 5:1055-63.

11. Bennish, M. L., Azad, A. K., Rahman, O. *et al.* Hypoglycemia during diarrhoea in childhood. *New England Journal of Medicine* 1990; 322: 1357–1363.
12. Bronzino JD, Austin-La France RJ, Chester JS, Morgane PJ. Effect of protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioral measures. *Brain Research* 1986; 384: 348-54.
13. Bronzino JD, Austin-La France JR, Morgane PJ. Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. *Brain Research* 1990; 515: 45-50.
14. Bronzino JD, Austin La France RJ, Morgane PJ, Galler JR. Dietinduced alterations in the ontogeny of long-term potentiation. *Hippocampus* 1996; 6:109–17.
15. Bushinsky, D. A. and Monk, R. D. Electrolyte quintet, calcium. *Lancet* 1998; 352: 306–311.
16. Caddell, J. L. Magnesium in protein-calorie malnutrition. *Journal of Pediatrics* 1965; 66: 392–411.
17. Chandra, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1997; 66: 460S–463S
18. Crespo D, Stanfield BB, Cowan WM. Evidence that lategenerated granule cells do not simply replace earlier formed neurons in the rat dentate gyrus. *Exp Brain Res* 1986; 62: 541-8.
19. Debassio WA, Kemper TL. The effects of protein deprivation on neuronal migration in rats. *Dev Brain Res* 1985;20: 191-6.
20. Diop AG, de Boer HM, Mandlhate C, Prilipko L, Meinardi H. The global campaign against epilepsy in Africa. *Acta Trop.* 2003 Jun;87(1): 149-59.
21. Dobbing J. Malnutrition et développement du cerveau. *La Recherche* 1976; 7: 139-46.
22. Dobbing J, Hopewell JW, Lynch A. Vulnerability of developing brain. *Exp Neurol* 1971; 32: 439-47.

23. Erinoso, H. O., Akinbami, F. O. and Akinyinka, O. O. Prognostic factors in severely malnourished hospitalised Nigerian children. *Tropical and Geographical Medicine* 1993; 45: 290–293.
24. Forbes WB, Stern WC, Tracy CA, Resnick O, Morgane PJ. Effect of chronic protein malnutrition on experimentally induced seizures in the rat. *Exp Neurol* 1978;62:475-81.
25. Gajana, A., Thenmozhi, V., Samuel, P. P. *et al.* A community based study of subclinical flavivirus infections in children in an area of Tamil Nadu, India, where Japanese encephalitis is endemic. *Bulletin of the World Health Organisation* 1995; 73: 237–244.
26. Galler JR. Children and famine: long term effects on behavioral development. *Ambulatory Child Health* 2001;7:85–95.
27. Gietzen DW, Dixon KD, Truong BG, Jones AC, Barret JA, Washburn DS. Indispensable amino acid deficiency and increased seizure susceptibility in rats. *AM J Physiol* 1996; 271: R1-R7.
28. Grantham-Mc Gregor SM, Powell C, Stewart M, Schofield WN. Longitudinal study of growth and development of young Jamaica children recovering from severe protein-energy malnutrition. *Develop Med Child Neurol* 1982; 24: 321-31.
29. Hauser WA. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia* 1994; 35 (S2); S1—6.
30. Iloeje, S.O., 1991. Febrile. Convulsions in a rural and an urban population. *East Afr. Med. J.* 1991; 68: 43-51.
31. Jensen FE, Baram TZ. Developmental seizures induced by common early-life insults: short and long-term effects on seizure susceptibility. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2000; 6: 253-57.

32. Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL. Developmental changes in GABAergic actions e seizures susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 2001; 21: 9770 – 81.
33. Kumar, S. and Berl, T. Electrolyte quintet, Sodium. *Lancet* 1998; 352: 220–228.
34. Morgane PJ, Austin La- France RJ, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:91-128.
35. Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Galler JR. Malnutrition and the developing central nervous system. In: Isaacson RL, Jensen KF, editors. *The vulnerable brain: nutrition and toxins*. New York: Plenum Publishing Corporation; 1992. p. 3–44.
36. Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002 ; 26: 471-83.
37. Newell, E., Vyungimana, F., Geerts, S., Van Kerckhoven, I., Tsang, V.C., Engels, D. Transversal prevalence of cysticercosis in epileptics and members of their families in Burundi. *Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997; 91: 389-391.
38. Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistella V. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78: 39-44.
39. Nunes ML, Liptáková S, Velisková J, Sperber EF, Moshé SL. Malnutrition Increases Dentate Granule Cell Proliferation in Immature Rats After Status Epilepticus. *Epilepsia*, 41 (suppl 6): S48-S52, 2000.
40. Nunes ML, Teixeira GC, Fabris I, Gonçalves RA. Evaluation of the nutritional status in institutionalized children and its relationship to the development of epilepsy. *Nutritional Neuroscience* 1999; 2: 139-45.

41. Palencia G, Calvillo M, Sotelo J. Chronic malnutrition caused by a corn-based diet lowers the threshold for pentylenetetrazoleinduced seizures in rats. *Epilepsia* 1996; 37: 583-86.
42. Palencia G, Teixeira F, Ortiz A, Perez R, Sotelo J. Reversibility of the alterations induced by chronic alcoholism and malnutrition in rats after alcohol withdrawal and proper nutrition. *J Stud Alcohol* 1995;56: 140-6.
43. Parent JM, Janumpalli S, McNamara JO, Lowenstein DH. Increase dentate granule cell neurogenesis following amygdala Kindling in the adult rat. *Neurosci Lett* 1998; 17: 3727-38.
44. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 1997; 17:3727-38.
45. Paulsen O, Moser EI. A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1998; 21:273–8.
46. Pavone P, Incorpora G, Fiumara A, Parano E, Trifiletti RR, Ruggieri M. Epilepsy is not a prominent feature os primary autism. *Neuropediatrics* 2004; 35: 207-10.
47. Pellock JM. Understanding co-morbidities affecting children with epilepsy. *Neurology* 2004; 62 (S2): S17-23.
48. Perry, T. L., Hansen, S., Kennedy, J. *et al.* Amino acids in human epileptogenic foci. *Arch Neurol* 1975; 32:752–754
49. Stern WC, Forbes WB, Resnick O, Morgane PJ. Seizure susceptibility and brain amine levels following protein malnutrition during development in the rat. *Brain Res* 1974;79: 375-84.
50. Strupp BJ, Levitsky DA. Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. *J Nutr* 1995; 125: 2221S-32S.

51. Taber KH, Fuller GN, Stanley JC, De France JF, Wiggins RC. The effects of postnatal undernourishment on epileptiform kindling of dorsal hippocampus. *Experientia* 1980; 36: 69-70.
52. Tonkiss J, Galler J, Morgane PJ, Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ. Prenatal protein malnutrition and postnatal brain function. *Ann NY Acad Sci* 1993; 678 :215–27.
53. Tourinho H. Desnutrição na infância. In: Duncan BB, Schmidt MI, Giugliani E, eds. *Medicina Ambulatorial*. Porto Alegre. Editora: Artes Médicas, 1992; 85-91.
54. van Gelder NM. Malnutrition, cerebral excitability and intelligence. *Microsc Electron Biol Cel* 1984; 8: 227–43.
55. Van Gelder, N. M., Sherwin, A. L. and Rasmussen, T. Amino acid content of epileptogenic human brain. *Brain Research* 1972; 40: 385–393.
56. Wood, J. H., Hare, T. A., Glaeser, B. S. *et al.* Low cerebrospinal fluid gamma aminobutyric acid content in seizure patients. *Neurology* 1979; 29: 1203–1208.