



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE
- PPGSHMA**

Waleska Maria Almeida Barros

**EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE A
PLASTICIDADE SINÁPTICA NO HIPOCAMPO DE
RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO
PRECOCEMENTE**

Vitória de Santo Antão

2013

Waleska Maria Almeida Barros

**EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE A
PLASTICIDADE SINÁPTICA NO HIPOCAMPO DE
RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO
PRECOCEMENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Fidalgo Amorim

Coorientador: Profa. Dra. Rhowena Jane Barbosa de Matos

Vitória de Santo Antão

2013

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV
Bibliotecária Jaciane Freire Santana

B277e Barros, Waleska Maria Almeida
Efeitos do ambiente enriquecido sobre a plasticidade sináptica no
hipocampo de ratos adultos submetidos à desnutrição precocemente / Waleska
Maria Almeida Barros. Vitória de Santo Antão: O autor, 2013.
Xv, 97 folhas: fig.; tab.

Orientador: Marco Antonio Fidalgo Amorim.
Co-orientador: Rhowena Jane Barbosa de Matos.
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade
Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2013.

1. Neuroplasticidade. 2. Memória. 3. Nutrição Perinatal. I. Amorim, Marco
Antonio Fidalgo. II. Matos, Rhowena Jane Barbosa de. Título.

636.0852 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-029/2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE - MESTRADO ACADÊMICO



Dissertação de Mestrado apresentada por **Waleska Maria Almeida Barros** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE A PLASTICIDADE SINÁPTICA NO HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PRECOCEMENTE", orientada pelo Prof. Dr. Marco Fidalgo Amorim, aprovada no dia 30 de outubro de 2013 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa
Depto. de Fisiologia e Farmacologia - UFPE

Dra. Lisiane dos Santos Oliveira
Núcleo de Enfermagem - CAV/UFPE

Dra. Zelyta Pinheiro de Faro
Núcleo de Nutrição - CAV/UFPE

Autor

Waleska Maria Almeida Barros

Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente – PPGSHMA
Rua do Alto do Reservatório, S/N – Bela Vista – Vitória de Santo Antão – PE
55608-680 Fone/Fax: (81) 3526.4094
www.ufpe.br/ppgshma - E-mail: ppgshma@gmail.com

“Somos aquilo que recordamos e também somos
o que resolvemos esquecer”
Izquierdo, I., 2002.

Dedico essa Dissertação à Nossa Senhora,
ao Seu filho Jesus e à minha
família querida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter me permitido realizar esse grande sonho, que há algum tempo seria inimaginável. À Sua mãe Nossa Senhora de quem sou inteira devoção e por quem posso solicitar intercessão junto ao Seu Filho Jesus.

À minha querida vizinha Iracema que me ensinou desde a infância através de seu exemplo de dignidade, a importância de preceitos religiosos, éticos e morais, demonstrando-me a amar, ajudar o próximo e compadecer-me com o sofrimento dos outros; hoje, do alto dos seus 97 anos mantém-se me amando e orientando-me de sua maneira. Dedico toda essa dissertação à senhora. Amo-lhe infinita e eternamente.

Aos meus pais, Argemiro e Giselda, que diante de tantos sofrimentos ensinaram-me que educação é algo essencial na nossa vida e que poderiam oferecer-me de forma que ninguém teria o poder de retirar-me. Faço tudo por vocês, amo-lhes incondicionalmente.

Ao meu irmão Caio que em 2012 ensinou-me o real sentido da palavra AMOR. Conte SEMPRE comigo. À sua esposa Mônica, que agora formando uma família espero que sejam muito felizes. Obrigada por ajudar-me em momentos de ajustes finais desta dissertação.

À minha coorientadora Profa. Rhowena Jane Barbosa de Matos por quem destino grande apreço e com quem tenho aprendido diariamente através de sua imensa sabedoria; após 10 anos, reencontro feliz com certeza guiado por Deus; muito obrigada pela confiança despendida, espero retribuir-lhe à altura. Que Deus a abençoe.

Ao meu orientador Prof. Marco Antonio Fidalgo Amorim, por ter aceitado ajudar-me nessa caminhada, muito obrigada.

Ao MARAVILHOSO grupo de pesquisa da Profa. Rhowena Matos: Matheus (rumo aos Estados Unidos, cientista nato, culto, educado como poucas pessoas que conheço, competentíssimo e futuro companheiro de profissão, torço por você!), Tercya (Tercynha, futura doutora, obrigada por tudo: muito sábia, humilde, coração enorme, você merece tudo de bom! Obrigada por ter me aguentado...), Priscila (Pri, futura nutricionista de mão cheia, adoro você, espero continuarmos amigas), Eloísa (rumo à França, que dê tudo certo por lá...), Jefferson (muito obrigada pela ajuda nos momentos de cansaço...), Marília (Marilly, você foi uma grata surpresa, muito gente boa, valeu...), Caroline (Carol, super meiga, merece tudo de bom, boa sorte). Enfim, a todos vocês fica o meu imenso agradecimento, saudades e a certeza de que sem vocês não teria conseguido, vocês são ÓTIMOS. Quero que se lembrem de mim e da frase da música: “Desesperar jamais,

afinal de contas não tem cabimento, entregar o jogo no primeiro tempo; nada de correr da raia, nada de morrer na praia, nada, nada, nada... nada de temer ” MUITO OBRIGADA...

Agradeço imensamente à Viviane Nogueira: Vivi, que conheço há pouco tempo mas que considero amiga, como você já me escreveu, estamos juntas para o que precisar; companheira de momentos difíceis, obrigada por tudo, foi muito bom lhe conhecer e espero continuarmos amigas. À Antônio, muito obrigada por suas consultorias.

À David Filipe, amigo, o meu muito obrigada, você é muito bom no que faz. Em momentos determinantes, você foi maravilhoso.

À profa. Belmira Andrade, agradeço por sua imensa generosidade e colaboração.

Aos meus GRANDES AMIGOS E PACIENTES DA AACD (Associação de Assistência à Criança Deficiente) pela paciência nos momentos em que muitas vezes não estava “inteira” para atender-lhes; sabemos o quanto foram importantes para mim nesses últimos anos. Muito obrigada pelo companheirismo e por me mostrar que sou importante para vocês, obrigada por tudo... Marquinho, não podia esquecer-me de você, sempre lhe enchendo pra consertar meu computador, valeu!

Agradeço aos órgãos de fomento CNPQ e FACEPE pelo apoio financeiro e viabilização do desenvolvimento dessa pesquisa.

Enfim, obrigada a todos que participaram dessa caminhada junto comigo. Obrigada pela confiança.

Até que enfim, juntos conseguimos...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo Geral	
1.2.2 Objetivos Específicos	
1.3 Revisão da Literatura	5
1.3.1 A Formação hipocampal e a memória de reconhecimento de objetos	
1.3.2 A memória e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)	6
1.3.3 A desnutrição e a teoria DOHaD	12
1.3.4 O ambiente enriquecido e o BDNF	15
CAPÍTULO 2	18
A desnutrição e o enriquecimento ambiental modificam a expressão do <i>bdnf</i>, interferindo nos eventos de memória?	19
Resumo	20
Abstract	21
Introdução	22
O hipocampo e a formação da memória	24
A desnutrição e a memória	28
Ambiente enriquecido, memória e BDNF	30
Desnutrição, ambiente enriquecido e memória	34
Conclusões	35
Referências Bibliográficas	37
CAPÍTULO 3	45
3.1 Objetivo, materiais e métodos do artigo original	

3.1.1	Objetivos	
3.1.2	Materiais e métodos	
3.1.2.1	Animais, dieta e ambiente enriquecido	
3.1.2.2	Conteúdo da dieta normoproteica e hipoproteica	46
3.1.2.3	Análise molecular	48
3.1.2.4	Avaliação dos indicadores somáticos	49
3.1.2.5	Avaliação comportamental	50
3.2	Artigo original	54
	Efeitos do ambiente enriquecido sobre a plasticidade sináptica no hipocampo de ratos adultos submetidos à desnutrição perinatal	
	Resumo	55
	Abstract	56
	Introdução	57
	Materiais e métodos	59
	Resultados e discussão	63
	Referências bibliográficas	82
	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	86
	REFERÊNCIAS	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Primeira Figura do Capítulo 1: Vias neuronais de entrada e saída do hipocampo	6
Figura 1.2	Segunda Figura do Capítulo 1: Célula nervosa onde ocorre a síntese, processamento e liberação do BDNF	8
Figura 1.3	Terceira Figura do Capítulo 1: Vias de sinalização do pro BDNF e mBDNF	10
Figura 1.4	Quarta Figura do Capítulo 1: Modelo sináptico da atuação do BDNF	11
Figura 1.5	Quinta Figura do Capítulo 1: A ação do BDNF sobre os neurônios imaturos, astrócitos e microglia	12
Figura 1.6	Sexta Figura do Capítulo 1: Efeitos da desnutrição nos períodos precoces da vida no organismo adulto	13
Figura 1.7	Sétima Figura do Capítulo 1: Efeito dos fatores ambientais e mecanismos epigenéticos no funcionamento do hipocampo, córtex e SNA	14
Figura 1.8	Oitava Figura do Capítulo 1: Efeito do AE sobre o aumento nos níveis de BDNF, a neurogênese e a plasticidade sináptica	16
Figura 3.1	Primeira Figura do Capítulo 3 (objetivo, materiais e métodos do artigo original): Desenho experimental do estudo	47
Figura 3.1.2	Segunda Figura do Capítulo 3 (objetivo, materiais e métodos do artigo original): A e B: Gaiolas do Ambiente Enriquecido	47
Figura 3.1.3	Terceira Figura do Capítulo 3 (objetivo, materiais e métodos do artigo original): A) Balança eletrônica digital (Marte, modelo S-1000) e B) mensuração do comprimento naso anal com papel milimetrado e fita métrica	50
Figura 3.1.4	Quarta Figura do Capítulo 3 (objetivo, materiais e métodos do artigo original): Campo aberto utilizado para a realização do teste de memória de reconhecimento de objetos	52
Figura 3.1.5	Quinta Figura do Capítulo 3 (objetivo, materiais e métodos do artigo original): Labirinto em cruz elevado utilizado para realização do teste de ansiedade	51
Figura 3.2	Primeira Figura do Capítulo 3 (artigo original): Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do peso neonatal de ratos	64

Figura 3.2.1 Segunda Figura do Capítulo 3 (artigo original): Evolução ponderal. Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do peso corporal de ratos a partir de 40 dias	65
Figura 3.2.2 Terceira Figura do Capítulo 3 (artigo original): Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do Índice de Massa Corporal (IMC) neonatal de ratos	66
Figura 3.2.3 Quarta Figura do Capítulo 3 (artigo original): Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do índice de massa corporal (IMC) de ratos	67
Figura 3.2.4 Quinta Figura do Capítulo 3 (artigo original): Efeitos a longo prazo da desnutrição sobre o tempo de exploração do braço aberto no teste de ansiedade	68
Figura 3.2.5 Sexta Figura do Capítulo 3 (artigo original): Tempo de permanência no centro do labirinto em cruz elevado	69
Figura 3.2.6 Sétima Figura do Capítulo 3 (artigo original): Frequência de entrada no braço aberto do labirinto em cruz elevado	70
Figura 3.2.7 Oitava Figura do Capítulo 3 (artigo original): Efeitos a longo prazo da desnutrição perinatal após a exposição crônica ao ambiente enriquecido em ratos adultos sobre a expressão gênica do <i>bdnf</i> (A) e <i>trkb</i> (B)	71
Figura 3.2.8 Nona Figura do Capítulo 3 (artigo original): Efeitos tardios da desnutrição perinatal após a exposição ao ambiente enriquecido sobre a memória de reconhecimento de objetos (A, B e C)	73,74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Primeira Tabela do Capítulo 3 (objetivos materiais e métodos do artigo original): Composição das dietas à base de caseína	46
Tabela 1.2	Segunda Tabela do Capítulo 3 (objetivo, materiais e métodos do artigo original): Sequências de <i>primers</i>	49
Tabela 1.3	Terceira Tabela do Capítulo 3: Sequências de <i>primers</i>	61
Tabela 1.4	Quarta Tabela do Capítulo 3: Médias do peso corporal durante o período neonatal	64
Tabela 1.5	Quinta Tabela do Capítulo 3: Médias do peso corporal nos grupos controle e desnutrido após exposição ao AE	65
Tabela 1.7	Sexta Tabela do Capítulo 3: Médias do IMC dos grupos experimentais durante a lactação	66
Tabela 1.8	Sétima Tabela do Capítulo 3: Médias do IMC dos grupos controle e desnutrido após exposição ao AE	67

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervoso Central
AE	Ambiente Enriquecido
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
TrkB	Receptor Tropomiosina ligada à quinase
CREB	Proteína Ligante ao elemento de resposta ao AMPc
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
DG	Giro Denteado
DOHaD	Teoria Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença
MRO	Memória de Reconhecimento de objetos
LTP	Potenciação a Longo Prazo
CA1	Região “ <i>cornu ammon</i> ” 1
CA3	Região “ <i>cornu ammon</i> ” 3
EPSP	Potencial Excitatório Pós-sináptico
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NT3	Neurotrofina 3
CaMKII	Proteína Cálcio Calmodulina II
ERK	Proteína Cinase regulada por sinais extracelulares
NMDA	Receptor N-Metil-D- Aspartato
GABA	Ácido Gama aminobutírico
NO	Óxido Nítrico
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
E.V.A.	Etileno vinil acetato

RESUMO

O sistema nervoso (SN) possui habilidade para modificar sua organização morfofuncional em resposta a mudanças internas ou demandas externas, caracterizando-se assim a plasticidade cerebral. Fatores externos como a desnutrição durante as fases iniciais da vida podem alterar o desenvolvimento adequado do organismo e ocasionar na fase adulta danos nas funções do sistema nervoso. Entretanto, um outro fator ambiental, o ambiente enriquecido (AE), pode favorecer a memória através de alterações na expressão de fatores tróficos, especialmente o fator derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo. O presente estudo objetivou avaliar o efeito do ambiente enriquecido sobre a plasticidade sináptica no hipocampo de ratos adultos que foram submetidos à desnutrição no período perinatal. Foram utilizados ratos machos *Wistar* divididos em grupos segundo a dieta durante a gestação e lactação: controle (C) e desnutrido (D). Após o desmame, os filhotes receberam dieta Presence® e foram subdivididos segundo a exposição ao AE de 30 até 90 dias de vida: controle com AE (CAE); ou sem AE (CSAE); desnutrido com AE (DAE) ou sem AE (DSAE). A evolução ponderal foi modificada pela desnutrição e o peso ao nascer até os 70 dias de vida, após a exposição ao AE, foi menor que o controle; aos 80 dias, o grupo CAE apresentou menor peso, igualando-se ao DAE. Quanto aos aspectos de memória de reconhecimento de objetos, comparando intragrupo, tanto o CSAE quanto o DAE apresentaram memória de curta duração. A comparação entre grupos mostrou que a dieta e o ambiente enriquecido influenciaram na memória de longa duração, pois apenas o DAE aumentou o tempo de exploração do objeto novo. A dieta não modificou o comportamento dos grupos com relação à ansiedade. No entanto, após a exposição ao AE, o grupo CAE apresentou menor ansiedade e o DAE mostrou aumento no conflito de decisão de escolha. Quanto à expressão gênica do *bdnf*, a dieta provocou menor expressão no grupo DSAE e maior expressão após exposição ao AE nos grupos controle e desnutrido. Já quanto ao receptor *TrkB*, houve uma tendência à menor expressão no grupo DSAE e uma maior expressão no CAE e DAE. Esses resultados indicam que a dieta hipoproteica induziu baixo peso ao nascer e que essa modificação foi prolongada ao longo da vida, porém o AE não reverteu esse perfil, mostrando que há o efeito da plasticidade fenotípica sobre esse aspecto. Além disso, a dieta e o AE modificaram, a longo prazo, tanto o perfil gênico do *bdnf* quanto do seu receptor, bem como o comportamento de memória, demonstrando que o AE estimulou eventos plásticos no hipocampo dos indivíduos desnutridos, modificando assim a memória de longa duração. **Palavras-Chave:** BDNF, memória, neuroplasticidade, enriquecimento ambiental, má-nutrição.

ABSTRACT

The nervous system has the ability of modifying its morphofunctional organization in response to internal changes or external demands, featuring thus the brain plasticity. External factors such as the malnutrition during the early phases of life can alter the proper development of the organism, and cause in adulthood damages at the nervous system (NS) functions. However, another environmental factor, the enriched environment (EE), can enhance memory through changes at the expression of trophic factors, specially the brain derived neurotrophic factor (BDNF) at the adult animal brain. This study aimed to evaluate the effect of the enriched environment over the synaptic plasticity at the hippocampus in adult rats submitted to malnutrition during perinatal period of life. Male Wistar rats were used, divided in groups according to the diet during the gestation and lactation: control (C) and undernourished (D). After weaning, the littermates received Presence® diet and were subdivided according to the exposure to the EE from 30 to 90 days of age: Control with EE (CAE); or control without EE (CSAE); undernourished with EE (DAE) or without EE (DSAE). The weight gain was modified by the malnutrition and there was a decrease from the weight at birth until 70 days of age and after the exposure to EE; at 80 days of age, the DAE group recovered the weight. Regarding the object recognition memory aspects, both CAE and DAE groups exhibited more efficacy at short term memory, reducing the exploration time when compared with the without EE, however, only the DAE group demonstrated long term memory. The diet factor did not modify the group's behavior related to anxiety. However, exposure to EE, the group DAE reduced anxiety showed an increase in the conflict decision of choice. Regarding the gene expression of BDNF, the diet reduced DSAE group and increased after exposure to AE in the control and malnourished. As for the TrkB receptor, there was a tendency to decrease in the group DSAE, an increase in CAE and DAE. These results indicate that the low-protein diet induced low birth weight and that this modification was prolonged throughout life, but EA has not reversed this profile, showing that there is the effect of phenotypic plasticity on this aspect. In addition, modified diet and long-term AE, both the BDNF gene profile and its receptor, and the memory behavior, showing that the AE events stimulated hippocampus of plastics in malnourished individuals, thus altering their long-term memory.

Keywords: BDNF, memory, neuroplasticity, environment enrichment, undernutrition

CAPÍTULO 1

Introdução

O sistema nervoso possui habilidade para modificar sua organização morfofuncional em resposta ao ambiente circundante, especialmente durante o desenvolvimento precoce em que as células estão se diferenciando e os tecidos estão em desenvolvimento. Esta capacidade é baseada em mecanismos moleculares que conduzem ao controle da expressão gênica e da indução de fenótipos específicos na ausência de modificação na sequência de DNA, incluindo metilação do DNA e de histonas e ainda modificações covalentes na expressão do RNA não-codificante (Barouki *et al.*, 2012). Esse sistema se desenvolve em um processo dinâmico de síntese de componentes celulares, neurogênese e gliogênese, migração e diferenciação celular, aumento do volume das células e por último, maturação morfofuncional (Kempermann *et al.*, 2003). Tais eventos do desenvolvimento estão contidos nas fases de gestação, lactação e primeira infância, que são caracterizados por crescimento rápido, maturação de órgãos e sistemas, replicação e diferenciação celular, sendo chamado de período crítico do desenvolvimento. Neste intervalo de tempo o organismo se encontra mais vulnerável a insultos ambientais (Morgane, Mokler e Galler, 2002).

Hipóteses concordam com a susceptibilidade aumentada dos indivíduos que durante o período crítico do desenvolvimento sofreram agressões ao sistema nervoso (SN), tais como a desnutrição, ao surgimento de alterações metabólicas e comportamentais a longo prazo. Estudos em animais e seres humanos confirmam o papel essencial da dieta no início da vida (Maurage, 2008). A desnutrição tem sido reconhecida por causar a redução no número de neurônios, sinapses, arborização dendrítica e mielinização, os quais resultam em diminuição no tamanho do cérebro. Todas essas alterações no sistema nervoso central estão associadas ao atraso nas funções motoras e cognitivas, tais como o transtorno do déficit de atenção, memória e deficiência de aprendizagem (Laus *et al.*, 2011).

No entanto, o ambiente enriquecido (AE) é uma manipulação de habitação que aumenta os estímulos físico e social e modula a plasticidade no hipocampo e em outras regiões corticais em roedores. Essas modificações na plasticidade incluem a regulação positiva de fatores de crescimento, incluindo o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o aumento na neurogênese, sobrevivência celular, gliogênese e alterações na morfologia e expressão das células da glia (Williamson, Chao e Bilbo, 2012). Recentes evidências em nosso grupo de estudo utilizando um modelo de restrição dietética nos

períodos precoces da vida, revelaram diminuição na proliferação e sobrevivência de células no giro denteado (DG) do hipocampo. Tal tratamento reduziu o número de neurônios no DG do hipocampo nos animais submetidos à restrição de 50% da dieta fornecida ao grupo controle durante as fases de gestação e lactação (Matos *et al.*, 2011). Dessa maneira, considerando que o hipocampo apresenta propriedades morfológicas e bioquímicas que conferem ao mesmo uma alta vulnerabilidade a insultos ambientais, o presente estudo foi conduzido para testar a hipótese de que a desnutrição no período crítico do desenvolvimento pode induzir alterações tardias na plasticidade sináptica, promovendo um déficit na memória de reconhecimento de objetos.

Todavia, o AE pode ser uma ferramenta que favorece a organização da circuitaria sináptica, facilitando o aumento de fatores tróficos no encéfalo do animal adulto e a memória de reconhecimento de objetos. Diante dessas hipóteses, surgem as seguintes perguntas: as alterações na expressão do BDNF podem favorecer a plasticidade sináptica no hipocampo nesse organismo desnutrido? O AE facilita mecanismos de memória de reconhecimento de objetos no adulto desnutrido?

Uma questão crucial tanto em termos clínicos como experimentais, é compreender quais os mecanismos subjacentes entre a desnutrição nos períodos precoces da vida e os eventuais benefícios promovidos pela exposição ao AE até a fase adulta. Os efeitos da desnutrição e subnutrição são de grande interesse à comunidade científica em muitos países, incluindo o Brasil, devido à incidência generalizada de deficiência nutricional fetal e infantil, adicionados a evidências de que o insulto nutricional ocorrendo no período do desenvolvimento do cérebro é de longa duração e pode levar a sequelas permanentes na aprendizagem e no comportamento do indivíduo.

Além disso, estudos sobre os efeitos das agressões nutricionais no período fetal e neonatal no desenvolvimento de sistemas fisiológicos e os efeitos do AE sobre tais sistemas na vida adulta são de grande interesse para o nosso grupo de pesquisa, que vem se estabelecendo como um centro que visa estudar as doenças na vida adulta originadas no período perinatal. Dessa forma, procura assim entender as modificações moleculares e comportamentais do SN advindas de alterações nutricionais nos períodos precoces da vida, assim como os efeitos do AE como possível fator de facilitação da plasticidade sináptica do SN.

Sendo assim, o presente estudo tem interesse socioeconômico para o Brasil e do ponto de vista científico sai dos aspectos descritivos, base para o conceito DOHaD (Origem desenvolvimentista da Saúde e da Doença) descrito por Van den Berg, 2011 e busca analisar e investigar os mecanismos moleculares, fisiológicos e comportamentais acerca da

programação fetal. Além do mais, o nosso objetivo é fornecer dados para futuras estratégias de intervenção no âmbito do estudo da programação fetal, plasticidade cerebral e interações com o AE com a finalidade de favorecer uma melhoria na qualidade de vida dos indivíduos.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do ambiente enriquecido sobre a plasticidade sináptica hipocampal em ratos adultos que foram submetidos à desnutrição no período perinatal.

1.2.2. Objetivos específicos

- Analisar a desnutrição pela evolução do peso corporal e índice de massa corporal (IMC);
- Avaliar os efeitos da dieta e do ambiente enriquecido sobre a expressão gênica do *bdnf* e *TrkB* no hipocampo;
- Avaliar a memória de reconhecimento de objetos de curta e longa duração;
- Analisar se o ambiente enriquecido promove ansiedade.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1. A formação hipocampal e a memória de reconhecimento de objetos

O hipocampo é uma estrutura encefálica localizada na região temporal medial e responsável pelos estágios iniciais do processamento da memória e embora essa região desempenhe um papel importante como um centro de processamento sensorial, o mesmo também pode atuar como um local de armazenamento temporário de informações que contribuem para a o aprendizado. Desse modo, a plasticidade dessa região é essencial para o armazenamento da memória e aprendizado (Alonso *et al.*, 2005).

A memória declarativa ou explícita é definida como a memória para fatos e eventos e é muitas vezes dividida em episódica (memória para eventos dentro da própria vida) e memória semântica (conhecimento geral sobre os aspectos do mundo). As informações sobre atributos sensorial, espacial e contextual de objetos são elementos importantes de memórias declarativas. A memória de reconhecimento de objetos (MRO) é um tipo de memória declarativa e utilizada para estudar a neurobiologia deste tipo de memória. A integridade funcional do lobo temporal medial, incluindo o hipocampo, a amígdala e o córtex entorrinal é essencial para o processamento da memória de reconhecimento de objetos (Furini *et al.*, 2010).

Os trabalhos que induziram à LTP, do inglês "*long term potentiation*", começaram a surgir no final dos anos 1960, quando Terje Lomo e Timothy Bliss descobriram que alguns segundos de estimulação elétrica de alta frequência podem aumentar a transmissão sináptica no hipocampo de coelhos durante dias ou mesmo semanas (Neves, Cooke e Bliss, 2008). Mais recentemente, no entanto, o progresso na compreensão do mecanismo de LTP baseou-se em estudos *in vitro* de fatias hipocampais, visto que a organização dos neurônios hipocampais permite a sua secção de modo que a maior parte da circuitaria permanece intacta. Em tais preparações, o corpo celular dos neurônios piramidais está numa única camada, a qual é dividida em regiões distintas, sendo as principais CA1 e CA3 (Izquierdo *et al.*, 1999). O termo "CA" refere-se a *cornu Ammon*, do latim *Ammon's horn* (chifre de carneiro de Amon), o qual se assemelha à forma do hipocampo. Os dendritos das células piramidais da região CA1 formam uma banda espessa que recebe sinapses dos colaterais de Schaffer, os axônios advindos das células piramidais da região CA3 (Riedel e Micheau, 2001). Grande parte dos trabalhos que estudam a LTP o faz nas conexões sinápticas entre os colaterais de Schaffer e as células piramidais CA1, em que a

estimulação elétrica dos colaterais de Schaffer gera um potencial excitatório pós-sináptico (EPSP) nas células pós-sinápticas CA1 (Martin, Grimwood e Morris, 2000). Ver figura 1.

A LTP não ocorre apenas nas sinapses excitatórias do hipocampo, mas em outras sinapses em uma variedade de regiões do cérebro, incluindo o córtex, a amígdala e o cerebelo. A LTP também exibe a propriedade da especificidade de entrada: quando LTP's são induzidas pela estimulação de uma sinapse, o mesmo não ocorre em outras sinapses inativas que estão em contato com o mesmo neurônio (Zagrebelsky e Korte, 2013). Esta característica da LTP é consistente com o seu envolvimento na formação da memória, visto que o aumento seletivo na estimulação de determinados conjuntos de entradas é provavelmente necessário para armazenar informações específicas.

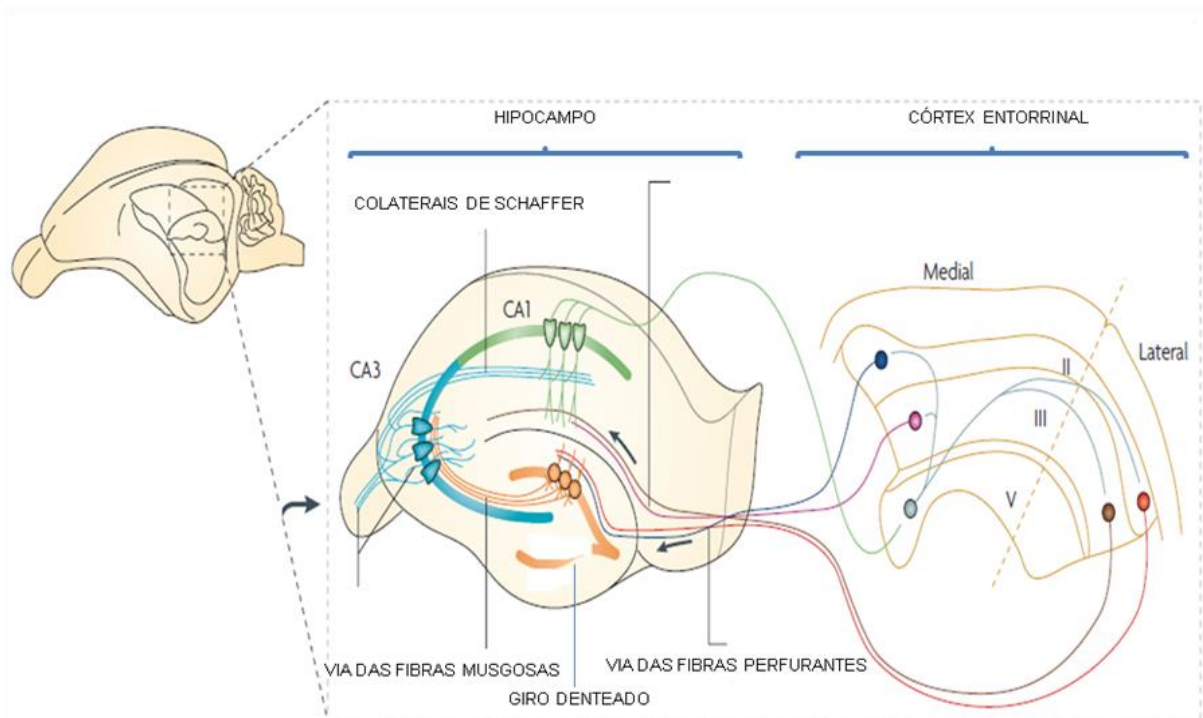


Figura 1: Vias neuronais de entrada e saída do hipocampo. Modificada de Neves *et al*, 2008.

1.3.2. A memória e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

Estudos sobre a aprendizagem e a memória em modelos animais têm identificado produtos de genes que são necessários para que esses processos ocorram, entre eles está o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), um pequeno dímero de proteína e o seu principal receptor, o TrkB, os quais são amplamente expressos no cérebro de mamíferos adultos (Murer, Yan e Raisman-Vozari, 2001).

Historicamente, as proteínas que se ligam a receptores transmembranas foram divididas em categorias, tais como os fatores neurotróficos, citocinas e fatores de crescimento. Dependendo do tipo de célula ou do local em que atuam, muitas destas proteínas podem exercer uma variedade de efeitos sobre as células, que vão desde a proliferação, maturação e suporte trófico (Choi *et al.*, 2009; Hagg, 2009). Sendo assim, o BDNF classifica-se como uma neurotrofina estruturalmente relacionada ao fator de crescimento do nervo (NGF) (Alonso, Vianna, Depino, *et al.*, 2002). Logo, as neurotrofinas são necessárias ao desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados e a classe também inclui a neurotrofina-3 (NT3), a neurotrofina-4/5, neurotrofina-6, e a neurotrofina-7 (Huang e Reichardt, 2001; Balu e Lucki, 2009; Cunha, Brambilla e Thomas, 2010). Do mesmo modo, a ação do BDNF no SNC do adulto vem sendo extensivamente estudada, provavelmente devido às evidências de que o mesmo apresenta um papel crítico na potenciação a longo prazo (LTP) (Ma *et al.*, 1998; Martin, Grimwood e Morris, 2000).

A proteína BDNF é sintetizada por um precursor, a proteína pré-pro BDNF resultante da clivagem de uma proteína de 32kDa pro BDNF, a qual é proteoliticamente clivada intracelularmente por enzimas, como a furina ou pro-convertases e secretada como os 14kDa do BDNF maduro (mBDNF) ou secretada como pro BDNF e depois clivada por proteases extracelulares, tais como as metaloproteinases e plasmina, para mBDNF (Huang e Reichardt, 2001). A extensão do processamento intracelular e extracelular de pro BDNF não é exatamente esclarecida, mas sabe-se que é menos processada por proteases intracelulares, em comparação a outras neurotrofinas, como o mBDNF. No entanto, as proteínas pro BDNF e mBDNF são preferencialmente separadas em vesículas de atividade secretora diferenciadas (Mowla *et al.*, 2001). Ver figura 2.

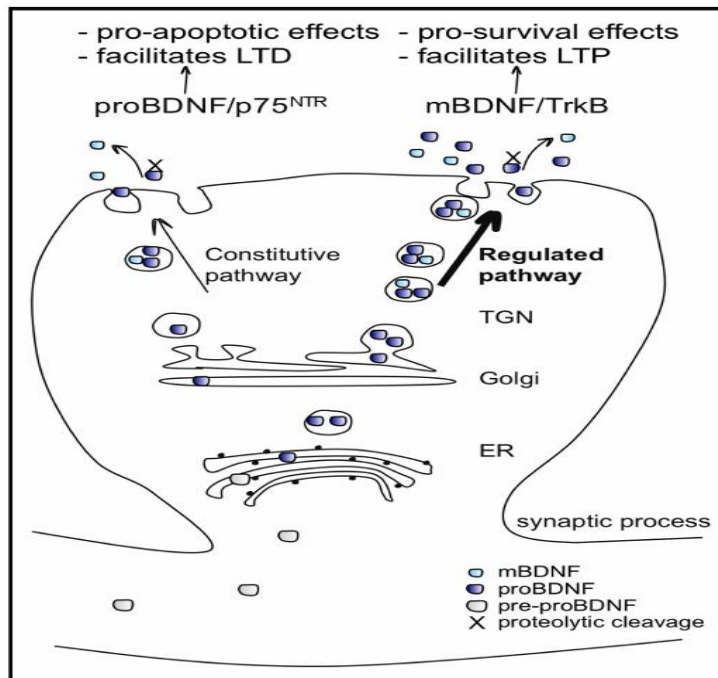


Figura 2: Célula nervosa (corpo neuronal e dendritos) onde ocorre a síntese, processamento e liberação do mBDNF. Figura modificada de Cunha *et al*, 2010.

O BDNF é localizado predominantemente na região somatodendrítica dos neurônios, mas também é encontrado nos dendritos, onde também é sintetizado a partir de RNAm em estreita proximidade com as espinhas dendríticas (Tongiorgi, 2008). O BDNF está presente nos compartimentos pré e pós-sinápticos e pode sofrer tanto transporte retrógrado como anterógrado. A liberação do BDNF na fenda sináptica pode ser regulada através de três mecanismos dependentes do local de síntese: 1. Mecanismo dependente do influxo de Ca^{++} nos terminais pré-sinápticos; 2. Dependente do influxo de Ca^{++} nos terminais pós-sinápticos; 3. Independente da liberação de Ca^{++} pelos terminais pré ou pós-sinápticos, pois depende da liberação de Ca^{++} a partir de reservas intracelulares (Poo, 2001; Tongiorgi, 2008).

O BDNF se liga à membrana e ativa duas diferentes proteínas receptoras transmembranas: a tropomiosina relacionada à quinase TrkB, receptor com alta afinidade, e a pan neurotrofina p75NTR, receptor com baixa afinidade. Praticamente todos os efeitos do BDNF são atribuídos à ativação do receptor TrkB. O Pro BDNF, p75NTR e isoformas de TrkB podem ser consideradas como mecanismos reguladores negativos da associação do BDNF/TrkB, com consequentes efeitos para a plasticidade sináptica e, talvez para a aprendizagem e a memória (Zagaar *et al.*, 2013). Em contrapartida, a ativação do receptor

TrkB pelo BDNF inicia três grandes vias de cascatas de sinalização: fosfolipase C γ (PLC γ), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a cascata regulada por quinases (ERK). A ativação da via fosfolipase C γ (PLC γ) está relacionada ao aumento de Ca⁺⁺ intracelular e à ativação da calmodulina quinase dependente de Ca⁺⁺ (CaMKII). A elevação de Ca⁺⁺ intracelular é um dos mais importantes resultados bioquímicos de sinalização do BDNF na célula pós-sináptica e além disso, a CaMKII ativa o fator de transcrição CREB, ativando desse modo a transcrição do BDNF (Choi *et al.*, 2009). Ver figura 3.

Assim, o BDNF pode regular a sua própria expressão através da ativação da sinalização da CaMKII e também pode ativar a via PI3K através da interação direta entre IRS1/IRS2 e PI3K, a qual medeia os efeitos de proteção do BDNF em vários tipos de células neuronais *in vitro*, incluindo neurônios do hipocampo. O BDNF também facilita a tradução de proteínas locais por ativação dos dendritos do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) via PI3K (Alonso, Vianna, Izquierdo, *et al.*, 2002). A ativação diferencial e o papel dessas cascatas na sobrevivência neuronal irão depender do tipo de célula e o envolvimento de estímulos fisiológicos ou patológicos específicos. O BDNF induz efeitos rápidos na transmissão sináptica e na excitabilidade da membrana, principalmente através da ativação dessas vias de sinalização e pode induzir à liberação pré-sináptica de glutamato e GABA através da fosforilação TrkB/ERK (Jovanovic *et al.*, 2000).

Para as sinapses glutamatérgicas, o aumento nos níveis de BDNF é induzido por um aumento no número de vesículas sinápticas. Na região pós-sináptica o BDNF também modula a transmissão excitatória e inibitória alterando a cinética da ativação de receptores NMDA glutamatérgicos e receptores GABA inibitórios. Parece, assim, que o BDNF mostra as propriedades de um neurotransmissor clássico: síntese no neurônio pré-sináptico, armazenamento em forma de vesículas, receptores pós-sinápticos e transporte por canal iônico (Zagrebelsky e Korte, 2013). O papel dos vários mecanismos de sinalização na aprendizagem e memória tem sido bem documentado, no entanto, o papel exato que o BDNF desempenha modulando estas vias de sinalização durante a aprendizagem continua a ser elucidado. Assim, o BDNF pode ativar múltiplas vias de sinalização que podem agir de forma a regular os efeitos necessários para a plasticidade sináptica e formação da memória. A interação entre cada uma destas tem vias intracelulares dependes dos níveis de BDNF e TrkB e se a sinalização foi ativada nos terminais pré ou pós sinápticos (Cunha, Brambilla e Thomas, 2010). Ver figura 4.

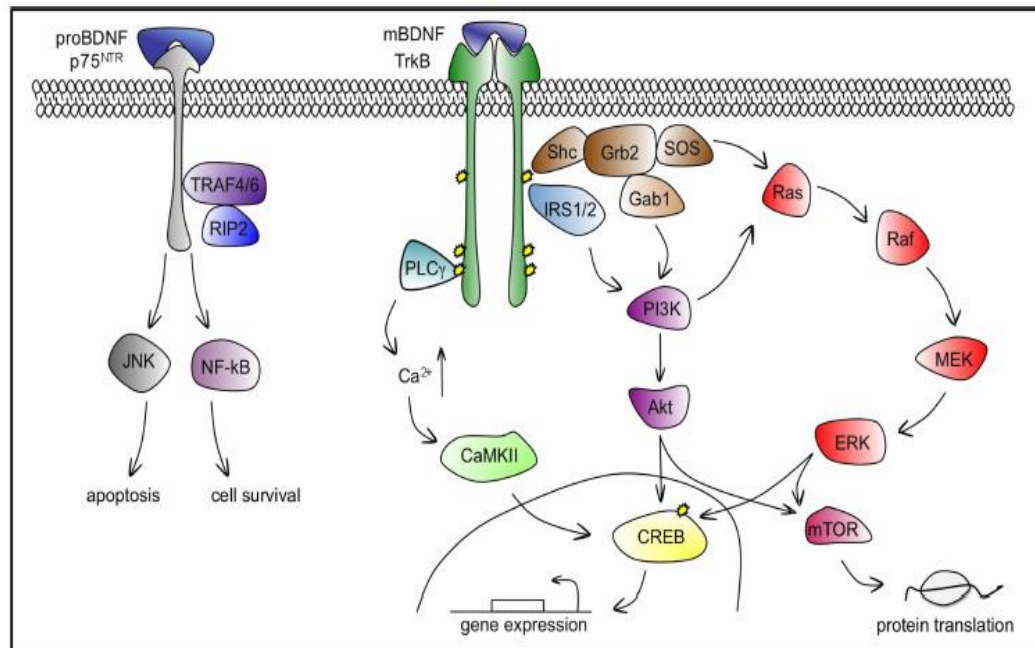


Figura 3: Vias de sinalização do pro BDNF e mBDNF no neurônio pré ou pós sináptico. Modificada de Cunha *et al.*, 2010.

Existem sistemas de *feedback* que controlam a atividade do BDNF: além de ser capaz de aumentar a sua própria transcrição através de um mecanismo mediado por CREB (Finkbeiner *et al.*, 1997), o BDNF também pode aumentar a expressão do receptor TrkB e além disso, pode regular a sua própria liberação (Haapasalo *et al.*, 2002). Sendo assim, estas propriedades podem contribuir para a estabilização das conexões sinápticas. No entanto, a exposição prolongada ao BDNF induz a um ciclo de *feedback* negativo, esgotando receptores TrkB na superfície neuronal e causando dessensibilização deste receptor (Frank *et al.*, 1996).

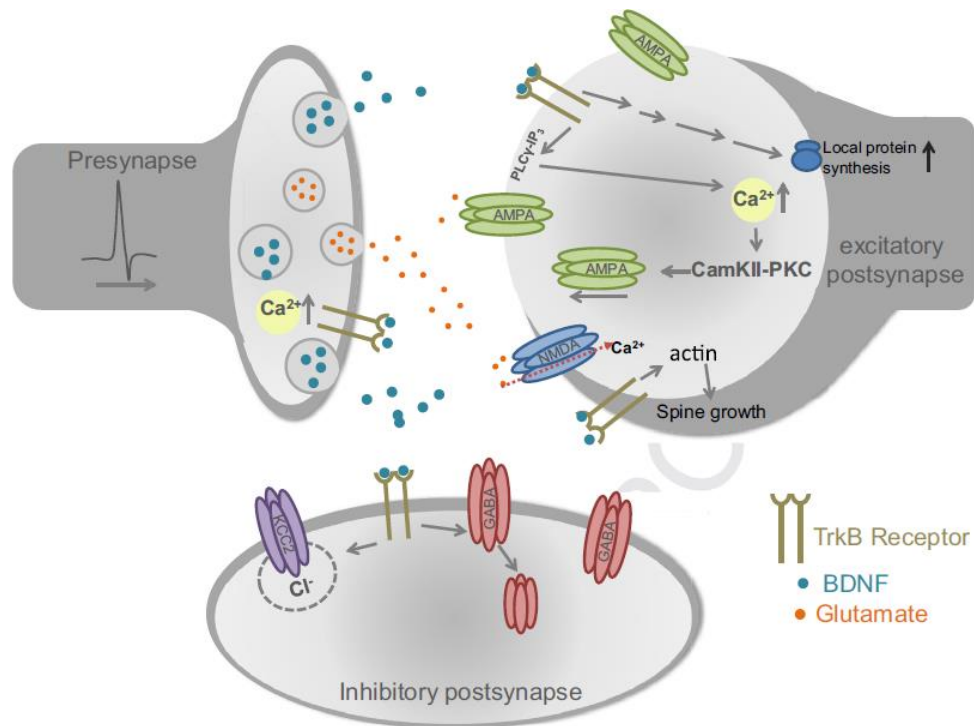


Figura 4: Modelo sináptico da atuação do BDNF na promoção, indução e manutenção da LTP. O BDNF é liberado a partir de terminais pré-sinápticos e pós-sinápticos de neurônios excitatórios e atua através do receptor TrkB nos terminais pré e pós-sinápticos dos neurônios excitatórios e sobre os neurônios inibitórios. Figura modificada de Zagrebelsky *et al*, 2013.

Evidências indicam que, à semelhança de outras neurotrofinas, o BDNF promove a diferenciação, o crescimento e a sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento do SNC e periférico (Huang e Reichardt, 2003). Entretanto, pouco se sabe sobre as funções análogas no cérebro adulto. A importância da sinalização mediada pelo BDNF para manter a sobrevivência e complexidade de dendritos no cérebro adulto, incluindo neurônios corticais glutamatérgicos, tem sido estabelecida (Ghosh, Carnahan e Greenberg, 1994; Cunha, Brambilla e Thomas, 2010). Ver figura 5.

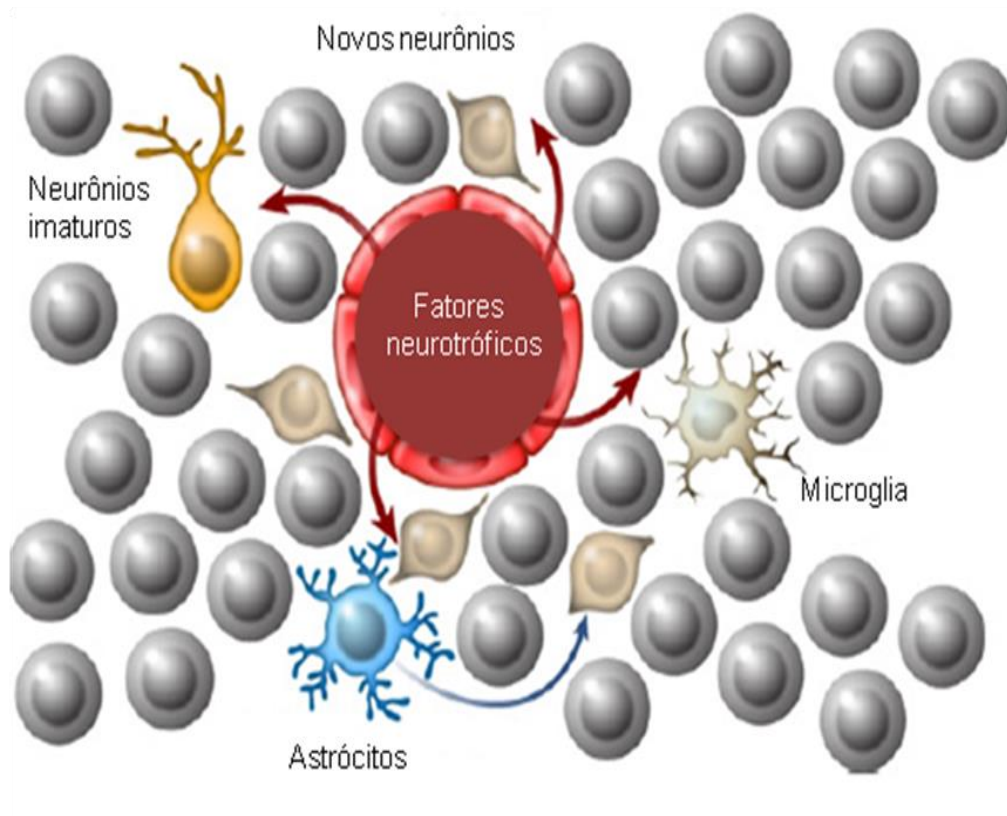


Figura 5: A ação do BDNF nos neurônios imaturos, astrócitos e microglia. Retirada de Johnson *et al*, 2009.

Em contrapartida, fatores ambientais, tais como a desnutrição atuando em períodos precoces da vida, podem levar a modificações permanentes no adulto, como o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica, diabetes tipo 2 (Gluckman e Hanson, 2004) e desordens neurológicas como déficits cognitivos. Já a exposição a um aparato de ambiente enriquecido, pode favorecer mecanismos de memória através da plasticidade sináptica aumentada e como consequência promover um aumento na expressão do BDNF, visto ser bem evidente na literatura que o aumento de estímulos visuais, proprioceptivos, exteroceptivos, além de um aumento na atividade física voluntária facilitam tal aumento de expressão gênica.

1.3.3. A Desnutrição e a Teoria DOHaD

Apesar de haver diminuição na prevalência da desnutrição em crianças ao longo dos anos, este ainda é um problema importante de saúde pública nos países em desenvolvimento (Zhang, Li e Yang, 2010), incluindo o Brasil (Monteiro *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2006). Todos os nutrientes são importantes para o crescimento e desenvolvimento do

cérebro, porém, alguns têm um efeito particularmente maior no desenvolvimento de circuitos cerebrais durante o período crítico do desenvolvimento. A importância destes nutrientes foi estabelecida essencialmente por meio de estudos animais provocando déficits de nutrientes e através do conhecimento de seu papel nas vias bioquímicas específicas, que são a base do crescimento e função neuronal e glial (Georgieff, 2007).

Sendo assim, estudos mostram que déficit de nutrientes, especialmente de proteína, durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso induz a alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do crescimento cerebral com impactos durante toda a vida, tais como redução no número de neurônios, sinapses, arborização dendrítica e mielinização, os quais resultam em diminuição no tamanho global do cérebro (Morgane, Mokler e Galler, 2002; Laus *et al.*, 2011). Ver figura 6.

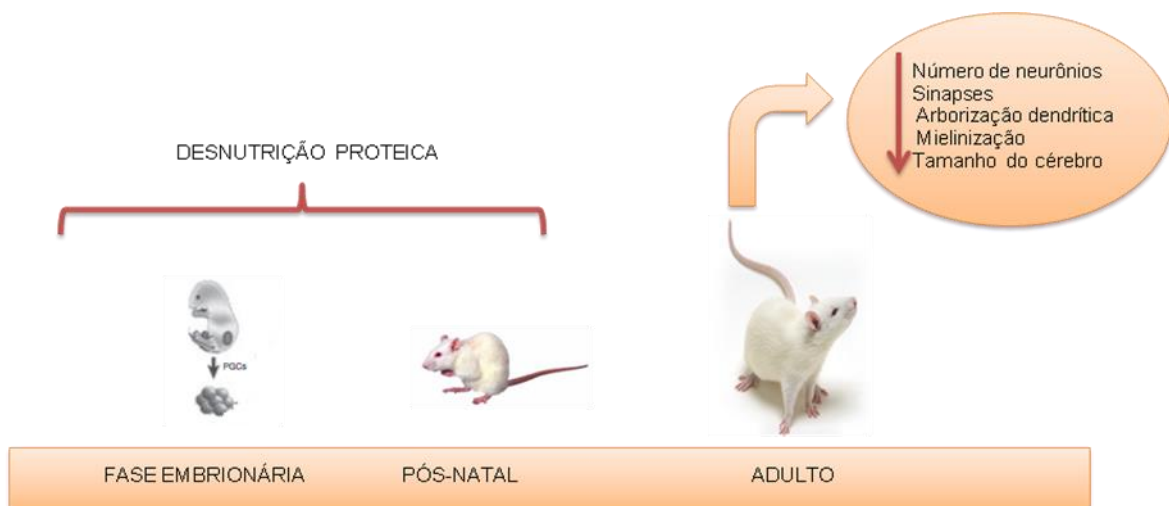


Figura 6: Esquema demonstrativo dos efeitos da desnutrição nos períodos precoces da vida no organismo adulto.

O mecanismo subjacente a esse processo parece estar associado aos efeitos irreversíveis da desnutrição no período crítico do desenvolvimento, os quais podem alterar o padrão de eventos celulares com consequências deletérias tanto na aquisição de padrões fisiológicos maduros do organismo quanto para a ocorrência de eventos metabólicos (Ozanne *et al.*, 2004). Para explicar tal mecanismo, surgiu ao longo dos últimos 20 anos a teoria da origem desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD), a qual propõe que existem adaptações fetais intrauterinas e nas condições maternas durante o desenvolvimento da morfofisiologia dos órgãos com a finalidade de poupar órgãos vitais fetais, tais como o cérebro (Van Den Bergh, 2011). Essa teoria vem sendo utilizada para descrever o processo pelo qual uma agressão ambiental, como a desnutrição com

incidência no período crítico, pode ter efeitos permanentes sobre a estrutura e a função dos órgãos na idade adulta (Santos *et al.*, 2003).

Dessa forma, estudos epidemiológicos retrospectivos realizados em humanos e modelos experimentais animais nas últimas décadas, demonstram que uma má nutrição durante o período crítico do desenvolvimento é um fator importante no desenvolvimento de síndromes metabólicas. Devido à sobreposição entre a má nutrição e o período crítico do desenvolvimento, as alterações funcionais tornam-se permanentes, resultando em um desequilíbrio duradouro nos mecanismos metabólicos, visto que estes não são totalmente amadurecidos ao nascimento e continuam o processo de maturação no período pós-natal imediato (Patel e Srinivasan, 2010). Assim, dados da literatura observaram uma correlação entre a desnutrição no período intrauterino, principalmente, e neonatal, com a ocorrência de doenças crônicas na vida adulta, tais como diabetes, hipertensão, enfermidades cardiovasculares, dislipidemias, obesidade, entre outras (Maurage, 2008).

Dentre as estruturas do SN que podem ter seu funcionamento alterado devido a fatores ambientais encontram-se o córtex e o hipocampo, os quais são particularmente vulneráveis à desnutrição proteico-energética (Katz, Davies e Dobbing, 1982; Jahnke e Bedi, 2007); quando tal processo de desnutrição ocorre nos estágios fetal e neonatal precoces pode reduzir o conteúdo de DNA e RNA neuronal e alterar o perfil de ácidos graxos, o que pode resultar em um menor número de neurônios, redução na síntese de proteínas e hipomielinização. O tamanho do cérebro é reduzido através de todos esses mecanismos como resultado de alterações nas quantidades de proteínas estruturais e do fator de crescimento, bem como as concentrações e produção de neurotransmissores. Mudanças ultraestruturais incluem a redução no número de sinapses e dendritos (Georgieff, 2007). Ver figura 7.

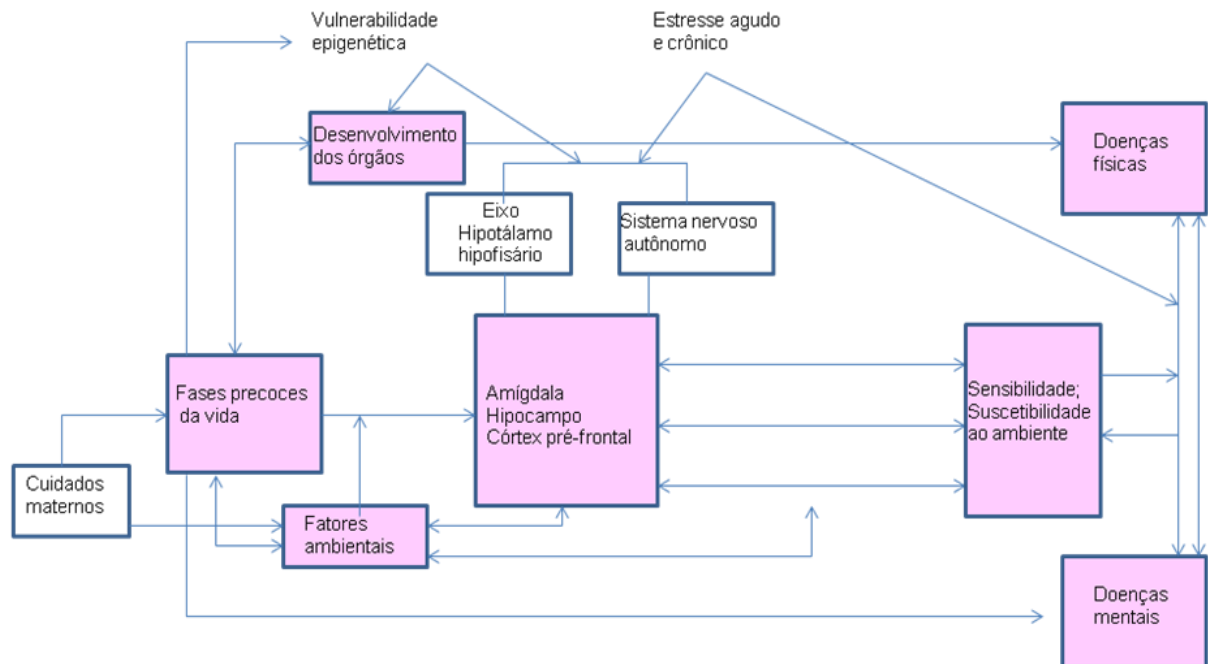


Figura 7: Efeito dos fatores ambientais e mecanismos epigenéticos no funcionamento do hipocampo, córtex e SNA. Há a representação da suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças físicas e/ ou mentais na idade adulta, que podem ter influências epigenéticas e de fatores ambientais ocorrendo durante as fases iniciais da vida e de fatores como estresse agudo e crônico na idade adulta. Figura modificada de Van den Bergh, 2011.

Dentre as áreas encefálicas, a formação hipocampal é uma estrutura que desempenha um papel importante na aprendizagem e memória (Ma *et al.*, 1998; Toni *et al.*, 2007). Entre os efeitos da restrição de nutrientes no período perinatal no sistema nervoso, alguns trabalhos experimentais prévios em animais evidenciam os efeitos em longo prazo da desnutrição na formação hipocampal mostrando déficit no número de células granulares do giro denteado (Jahnke e Bedi, 2007) e redução da proliferação celular (Matos *et al.*, 2011). A desnutrição no início da vida provoca um déficit permanente no número total de células granulares do DG, no entanto, não se sabe se esse déficit é devido à morte de células neuronais e / ou a um menor número de células que se diferenciam durante o período de neurogênese (Jahnke e Bedi, 2007).

1.3.4. O Ambiente Enriquecido e o BDNF

Outros fatores podem facilitar mecanismos cognitivos e geralmente estão relacionados à estimulação por AE e à atividade física voluntária, que juntos promovem

alterações nas funções motoras, aprendizagem e memória espacial, bem como nos comportamentos emocionais (Olson *et al.*, 2006; Madronal *et al.*, 2010; Begenisic *et al.*, 2011; Williamson, Chao e Bilbo, 2012; Rojas *et al.*, 2013). A interação entre um organismo e seu meio ambiente pode facilitar importantes mudanças comportamentais por aumentar a estimulação sensorial, motora, visual e cognitiva induzindo a estas alterações no sistema nervoso central (Madronal *et al.*, 2010). O enriquecimento ambiental é definido como "uma combinação de estímulos complexos de objetos inanimados e social que influenciam aspectos morfo-funcionais cerebral por aumentar a estimulação sensorial, cognitiva, motora e interação social" (Gelfo *et al.*, 2011).

A influência positiva do AE na memória e aprendizado de animais em laboratório vem sendo investigada desde a década de 50. Há estudos que evidenciam o quanto a neurogênese no hipocampo bem como o complexo dendrítico dos neurônios do hipocampo e algumas habilidades de aprendizado podem ser melhoradas por animais expostos ao AE (Beauquis *et al.*, 2010). Recentes estudos têm demonstrado que no neocortex paradigmas fisiológicos como comportamento, AE e atividade física voluntária podem induzir à neurogênese no hipocampo em adultos, podendo favorecer adicionalmente à gliogênese e à proliferação de microglia no córtex (Ehninger *et al.*, 2011).

Pesquisas experimentais demonstram que roedores alojados em gaiolas enriquecidas com acesso a novos objetos, rodas de exercício e aumento da interação social apresentam mudanças significativas na bioquímica do cérebro, morfologia sináptica e função neuronal comparados aos animais alojados em gaiola padrão (Jankowsky *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Pang e Hannan, 2013). Várias formas de neuroplasticidade, incluindo aquelas favorecidas pelo AE, são dependentes da síntese de proteínas para que ocorram alterações subsequentes na morfologia ou na organização sináptica das células (Mesa-Gresa, Perez-Martinez e Redolat, 2013).

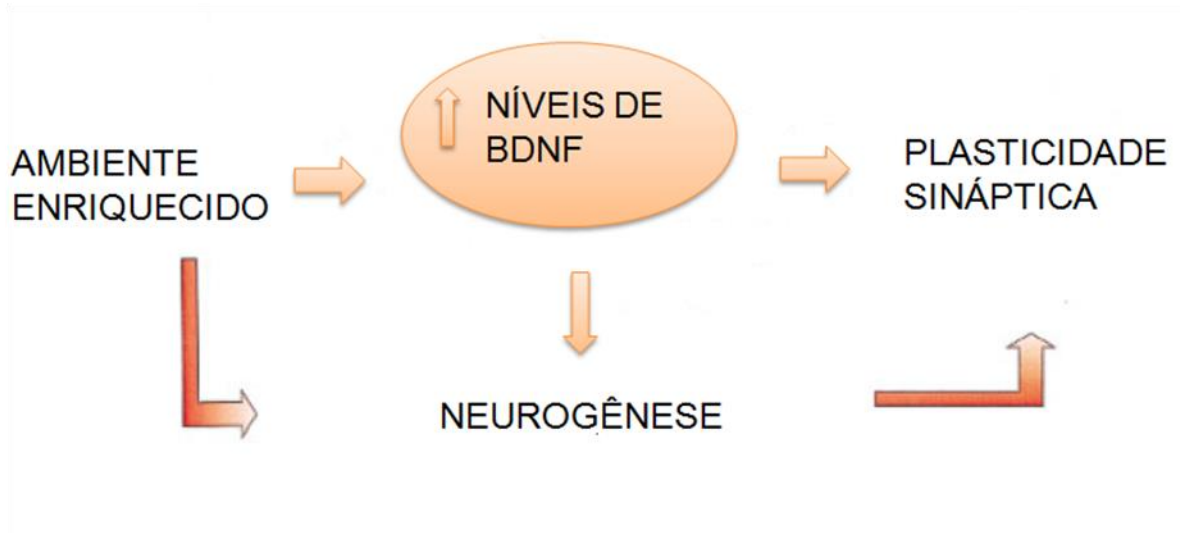


Figura 8: Efeito do AE sobre o aumento nos níveis de BDNF, a neurogênese e a plasticidade sináptica.

Estudos têm relatado aumento na expressão de fatores neurotróficos, particularmente o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de Crescimento de Nervo (NGF) após a exposição de animais ao AE (Birch, McGarry e Kelly, 2013; Rojas *et al.*, 2013). Os Níveis de RNAm do BDNF são aumentados em ratos alojados em gaiolas de AE e dessa forma, é sugerido que o BDNF pode estar envolvido em mecanismos que facilitam a aprendizagem e a memória. Várias manipulações nesta estrutura resultam em alteração na capacidade de aprendizagem e / ou desempenho de retenção em ratos, macacos e humanos. Por outro lado, o hipocampo tem o mais elevado nível de RNAm de BDNF entre as regiões do cérebro adulto (Choi *et al.*, 2009). Existe também um nível elevado da expressão do gene do receptor do BDNF (gene *trkB*) no hipocampo, sugerindo que o BDNF pode também desempenhar um papel na transdução de sinal nesta área. Além disso, a ativação do receptor N metil D aspartato (NMDA), é um componente necessário para a indução da LTP. Além do receptor de NMDA, a expressão de RNAm do BDNF pode também ser regulada através do receptor não-NMDA. Estes resultados sugerem que em conjunto a expressão do gene do *bdnf* pode ser associada à aprendizagem e aos processos de memória (Ma *et al.*, 1998). Ver figura 8.

Essas modificações na plasticidade sináptica provavelmente fornecem a base para inúmeras melhorias cognitivas após a exposição ao AE, visto que a habitação em AE melhora o desempenho de várias tarefas comportamentais incluindo vacância nos dois sentidos ativos, condicionamento contextual e atraso na alternância (Mesa-Gresa, Perez-

Martinez e Redolat, 2013). Talvez as melhorias mais bem estudadas ocorrem no labirinto aquático de Morris, onde os animais expostos ao AE alcançam uma plataforma submersa em um tempo menor que os animais condicionados em gaiolas padrão (Jankowsky *et al.*, 2005).

No entanto, ainda são escassas informações sobre como um organismo adulto, desnutrido na fase perinatal, reorganiza as conexões sinápticas e toda a maquinaria celular, como também se essa plasticidade favorecida pelo AE promove ajustes em níveis de expressão gênica do *bdnf* e seu receptor *TrkB*, repercutindo sobre os eventos de memória.

CAPÍTULO 2

Os resultados desta etapa estão apresentados a seguir no trabalho de revisão intitulado: **A desnutrição e o enriquecimento ambiental modificam a expressão do *bdnf*, interferindo nos eventos de memória?**, que será submetido à publicação pela revista Nutrition and Neuroscience.

A desnutrição e o enriquecimento ambiental modificam a expressão do *bdnf*, interferindo nos eventos de memória?

¹ Waleska Maria Almeida Barros; ² Matheus Cavalcanti Pinho, ³ Tércya Lúcidí de Araújo Silva, ⁴ Eloyza Karoline Rozendo dos Santos, ⁵ Jefferson Diego Costa Vasconcelos, ⁶ Marília Freire Isidro, ⁵ Marco Antonio Fidalgo Amorim, ⁵ Rhowena Jane Barbosa de Matos

¹Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão/PE;

²Departamento de Fisioterapia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFPE, Recife/PE;

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas (CCB), UFPE, Recife/PE; ⁵ Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte, Centro Acadêmico de Vitória (CAV) - UFPE, Vitória de Santo Antão/PE; ⁶Pós-graduação em Nutrição – UFPE, Recife/PE.

Nome e endereço da instituição para qual o trabalho deve ser atribuído:

Universidade Federal de Pernambuco

Centro Acadêmico de Vitória

Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte

Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista CEP: 55608-680

Vitória de Santo Antão/PE - Brasil

Endereço postal de cada autor:

Waleska Maria Almeida Barros, Centro Acadêmico de Vitória/Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório, S/N – Bela Vista – CEP 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

Rhowena Jane Barbosa de Matos, Centro Acadêmico de Vitória/Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte. Rua do Alto do Reservatório, S/N – Bela Vista – CEP 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

Nome, telefone, endereço de e-mail e número de fax do autor correspondente:

Rhowena Jane Barbosa de Matos, Telefone/fax: (081) 3523 3351

E- mail: rhowena.matos@ufpe.br / rhowenajane@gmail.com

Eu, Rhowena Jane Barbosa de Matos, declaro que o meu endereço de e-mail pode ser publicado.

Conflito de interesse: declaramos não haver conflitos de interesses.

RESUMO

Os fatores ambientais interferem nos processos de plasticidade neural, dentre eles a desnutrição nos períodos precoces da vida destaca-se como um dos principais fatores não genéticos que podem interferir no desenvolvimento morfofuncional do sistema nervoso, assim como a estimulação sensorial proveniente de ambientes enriquecidos. Esses dois fatores podem modificar áreas relacionadas à memória e à aprendizagem como o hipocampo, através de mecanismos relacionados à expressão gênica de fatores neurotróficos derivados do cérebro (*bdnf*), que podem interferir em processos de plasticidade sináptica, como exemplo, a memória. A facilitação sináptica da circuitaria neuronal do hipocampo pode ser estimulada pelo AE e alterada pela desnutrição precoce, o que pode interferir no funcionamento do hipocampo durante a vida adulta, através de mecanismos que utilizam o BDNF. O objetivo desse estudo foi verificar através de revisão de literatura as possíveis alterações morfofuncionais tardias no hipocampo após a desnutrição na idade precoce da vida e a estimulação através do AE, correlacionando tais mecanismos ao BDNF. Para tanto, as bases de dados eletrônicas Cochrane Library and Pubmed/ Medline (National Library of Medicine), Lilacs (Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SciELO (Scientific Electronic Library Online), foram consultadas utilizando-se as seguintes palavras-chave: “enrichment environment”, “BDNF”, “memory,” “undernutrition” e “hippocampus”. Assim, evidências da literatura científica sugerem que os mecanismos de plasticidade sináptica no hipocampo de animais adultos são influenciados pela desnutrição e o AE e essas alterações podem envolver a participação do BDNF como um regulador chave nos processos de memória no hipocampo de animais adultos.

PALAVRAS-CHAVE: ambiente enriquecido, BDNF, formação hipocampal, má nutrição, plasticidade neural e memória.

ABSTRACT

The environmental factors interfere at the neural plasticity processes, among them the malnutrition during the early life stands out as one of the main non genetic factors which can interfere at the morphofunctional development of the nervous system, as well as the sensory stimulation from enriched environments. Those two factors can modify areas related to memory and learning, such as the hippocampus, through mechanisms related to gene expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF), that can interfere on the synaptic plasticity processes, such as the memory. The synaptic facilitation of the neural circuitry in the hippocampus can be stimulated by the EE and altered by early malnutrition, which can interfere in the functioning ability during the adult life through mechanisms that utilize the BDNF. The objective of this study was to verify through literature review the possible late morphofunctional alterations in the hippocampus after malnutrition in early life and stimulation through EE, correlating those mechanisms to BDNF. Thus, the electronic database Library and Pubmed/ Medline (National Library of Medicine), Lilacs (Latin-american and Caribbean Literature in Health Sciences), SciELO (Scientific Electronic Library Online), were consulted using the key words: “enrichment environment”, “BDNF”, “memory,” “undernutrition” and “hippocampus”. Thereby, literature evidences suggest that synaptic plasticity mechanisms of adult animals are influenced by the malnutrition and EE. Therefore those alterations can involve the BDNF participation as a key-regulator on the memory processes in the hippocampus of adult animals.

KEYWORDS: enriched environment, BDNF, hippocampal formation, malnutrition, neural plasticity and memory.

INTRODUÇÃO

O sistema nervoso possui habilidade para modificar sua organização morfofuncional em resposta a mudanças internas ou demandas externas, caracterizando-se assim a plasticidade cerebral. Com isso, mecanismos neuronais podem estar envolvidos na facilitação sináptica, formando a base de algumas funções do cérebro que seria o processo de memória, funcionalmente classificado como um tipo de plasticidade sináptica. Houve muitos avanços no estudo dos mecanismos da memória nos últimos anos, dentre eles foram descritos os processos de sensibilização sináptica, habituação, potenciação a longo prazo (do inglês, “*long term potentiation*”, LTP) e depressão a longo prazo (do inglês, “*long term depression*”, LTD), que caracterizariam os eventos da memória. Isto é, LTP e LTD são termos que descreveriam as mudanças na eficiência sináptica, que de fato, envolvem vários mecanismos celulares e moleculares de diferentes sinapses, mediados por transdução de sinais dos circuitos neurais. Especificamente, a LTP foi evidenciada nos trabalhos de Eric Kandel no modelo que utilizava a *Aplysia*, um invertebrado, e relatos de estudos em áreas encefálicas de vertebrados, como o hipocampo, já vem sendo investigados desde 1973 por Bliss et al., os quais verificaram as bases dos mecanismos da formação da memória nessa estrutura ^(1, 2).

O hipocampo está localizado na região temporal medial e realiza funções de integralização dos mecanismos de aprendizagem e memória ⁽³⁾, além de estar envolvido na regulação de comportamentos motivacionais, hormonal, controle das emoções e resposta ao estresse. As subáreas envolvidas nessas funções hipocâmpais são topograficamente segregadas ao longo do eixo septo-temporal, em que a região dorsal participa dos processos de aprendizagem e memória, enquanto a ventral, comportamentos relacionados à ansiedade e emoções ⁽⁴⁻⁶⁾.

Alguns fatores exógenos podem interferir nessa plasticidade sináptica e ocasionar mudanças no desenvolvimento e/ou manutenção dos processos mnemônicos, podendo os mesmos serem facilitados ou inibidos, a fim de que se estabeleça uma função adequada. Dentre esses fatores podemos citar os efeitos da restrição de nutrientes no período perinatal no sistema nervoso. Alguns trabalhos experimentais prévios em animais evidenciam os efeitos à longo prazo da desnutrição no início da vida na formação hipocâmpa, tais como déficit no número de células granulares do giro denteado ⁽⁷⁻⁹⁾, redução da proliferação celular ^(10, 11) e de fatores neurotróficos ⁽¹⁰⁾, redução no grau de ramificação dendrítica das células

denteadas ⁽⁷⁾, redução da extensão e volume do plexo de fibras musgosas do hipocampo ⁽¹²⁾, alteração da memória espacial ⁽¹³⁾ e aumento no nível de células apoptóticas no giro denteado ⁽⁹⁾. Dentre as áreas encefálicas, a formação hipocampal é uma estrutura importante na aquisição de aprendizagem e memória e uma das áreas do sistema nervoso que apresenta células germinativas que possuem a capacidade de originar novas células neuronais (neurogênese) também na fase adulta ⁽¹⁴⁾. A desnutrição no início da vida provoca um déficit permanente no número total de células granulares no DG do hipocampo, provocando modificações morfofuncionais no sistema nervoso. Essas alterações podem decorrer de uma diminuição no número de neurônios e células gliais gerados durante o período de neurogênese e gliogênese ou ocorrerem devido à morte celular programada, como resultado de nutrientes insuficientes disponíveis ⁽⁹⁾.

Um outro efeito proveniente de fator exógeno ao organismo e que pode interferir na memória seria a estimulação por ambientes enriquecidos (AE), que também está associada à atividade física voluntária e juntos promovem alterações nas funções motoras ⁽¹⁵⁾, aprendizagem e memória ⁽¹⁶⁾, bem como nos comportamentos emocionais ⁽⁵⁾. O enriquecimento ambiental é definido como "uma combinação de estímulos complexos de objetos inanimados e sociais" que influenciam em aspectos morfofuncionais do sistema nervoso por aumentar a estimulação sensorial, cognitiva, motora e interação social ⁽¹⁷⁾. As alterações celulares, tais como a neurogênese e a densidade sináptica têm sido estimuladas por ambientes enriquecidos que promovam a atividade exploratória ⁽¹⁸⁾, associando a habilidade em diferentes testes comportamentais ⁽¹⁹⁾. Essas mudanças na circuitaria neural estão relacionadas às alterações de fatores neurotróficos, especialmente o fator derivado do cérebro (do inglês, "*brain-derived neurotrophic factor*", BDNF) ^(17, 20, 21). Tal mecanismo molecular subjacente ao AE que induz à neuroproteção atribui-se, em parte, à modulação positiva dos níveis de neurotrofinas. Essas proteínas estão envolvidas tanto na sobrevivência, como na morte neuronal e plasticidade neural ⁽¹⁶⁾.

O termo ambiente enriquecido (AE) como um processo experimental foi introduzido no final da década de 1940 por Donald Hebb ^(22, 23) e embora não haja nenhum consenso que defina paradigmas adequados de enriquecimento ambiental, animais são geralmente mantidos em grupos maiores e em gaiolas contendo túneis, brinquedos, escadas e rodas de corrida, os quais tornam o ambiente complexo e variável ⁽²⁴⁾. Atualmente uma das regiões encefálicas mais estudadas para determinar os efeitos do AE no tecido nervoso é a formação hipocampal ⁽²⁵⁾ visto que os efeitos do AE influenciam na plasticidade neural ^(26, 27).

Os efeitos positivos da estimulação ambiental não são restritos à morfologia celular, mas também ao funcionamento do sistema nervoso como um todo. Estudos

comportamentais mostraram que a exposição ao AE aumenta a capacidade de memória em várias tarefas, particularmente em ensaios de aprendizagem espacial ⁽²⁸⁻³⁰⁾. Desse modo, a discussão sobre plasticidade no hipocampo envolve alterações na expressão de fatores tróficos, que são promotores de sobrevivência e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento ^(31, 32), visto que o AE aumenta a expressão de vários fatores neurotróficos que têm sido implicados na proliferação, diferenciação e sobrevivência neuronal tais como: os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator de crescimento neuronal (NGF), neurotrofina-3 (NT-3) e muitos dos seus correspondentes receptores aumentam no hipocampo após exposição sequencial ao AE ^(27, 31). Assim, como o AE e o exercício voluntário (Vex) podem aumentar os níveis de BDNF, a quantidade da expressão deste está diretamente relacionada à quantidade de Vex que um animal realize ⁽³¹⁾.

Portanto, o presente estudo visa à realização de uma revisão bibliográfica sobre os efeitos da desnutrição precoce na vida sobre a memória e a relação entre os mecanismos subjacentes advindos do AE, da expressão gênica do BDNF e da memória. Além disso, se há estudos sobre o efeito da reversão pela exposição ao AE sobre as alterações da desnutrição no funcionamento do hipocampo de ratos adultos que foram desnutridos precocemente.

O Hipocampo e a Formação da Memória

Os trabalhos que induziram à LTP começaram a surgir no final dos anos 1960, quando Terje Lomo e Timothy Bliss descobriram que alguns segundos de estimulação elétrica de alta frequência podem aumentar a transmissão sináptica no hipocampo de coelho durante dias ou mesmo semanas ⁽²³⁾. Mais recentemente, no entanto, o progresso na compreensão do mecanismo de LTP baseou-se fortemente em estudos in vitro de fatias hipocâmpais, visto que a organização dos neurônios hipocâmpais permite a sua secção de modo que a maior parte da circuitaria permaneça intacta. Em tais preparações, o corpo celular dos neurônios piramidais está numa única camada, a qual é dividida em várias regiões distintas, sendo as principais CA1 e CA3 ⁽³³⁾. "CA" refere-se a *cornu Ammon*, do latim *Ammon's horn* (chifre de carneiro de Amon), o qual se assemelha à forma do hipocampo. Os dendritos das células piramidais da região CA1 formam uma banda espessa que recebe sinapses dos colaterais de Schaffer, os axônios advindos das células piramidais da região CA3 ⁽³⁴⁾. Grande parte dos trabalhos que estudam a LTP o faz nas conexões sinápticas entre os colaterais de Schaffer e as células piramidais CA1, em que a

estimulação elétrica dos colaterais de Schaffer gera um potencial excitatório pós-sináptico (EPSP) nas células pós-sinápticas CA1 ⁽³⁵⁾.

A LTP não ocorre só nas sinapses excitatórias do hipocampo, mas em outras sinapses em uma variedade de regiões do cérebro, incluindo o córtex, a amígdala e o cerebelo. A LTP também exibe a propriedade da especificidade de entrada: quando LTP's são induzidas pela estimulação de uma sinapse, o mesmo não ocorre em outras sinapses inativas que estão em contato com o mesmo neurônio ⁽³⁶⁾. Esta característica da LTP é consistente com o seu envolvimento na formação da memória, visto que o aumento seletivo na estimulação de determinados conjuntos de entradas é provavelmente necessário para armazenar informações específicas.

Pesquisadores mostraram que o bloqueio dos receptores NMDA impede a indução da LTP *in vivo* e *in vitro*, e dessa maneira resulta em prejuízo à memória espacial, o que foi verificado utilizando-se o labirinto aquático de Morris ⁽³⁷⁾. Além do mais, alguns pesquisadores que trabalham com drogas verificaram que estas interferem no funcionamento de receptores de glutamato do tipo metabotrópicos (mGluR) e reduzem a LTP *in vivo*, assim como provoca prejuízos à memória espacial ⁽³⁸⁾. Outro tipo de manipulação, a genética, também é utilizada para demonstrar uma ligação entre a LTP e um tipo de memória específica, a de longa duração (MLD). Um estudo realizado com a subunidade R1 modificada do receptor NMDA na região CA1 do hipocampo de camundongos mostrou um retardo na LTP, o que resultou em um dano na memória espacial ⁽³⁹⁾.

Tem havido um avanço nas pesquisas que estudam o papel das proteínas cinases na LTP, visto ser sabido que tais proteínas influenciam na indução, expressão e manutenção deste evento fisiológico. Assim, algumas proteínas cinases, tais como a proteína cinase dependente de calmodulina (CaMKII), a proteína cinase A dependente de AMPc (PKA), proteína cinase C (PKC), proteínas que são tirosina cinases e mais recentemente, tem-se investigado muito a respeito da MAPK/ ERK, as quais têm sido estudadas por desempenhar um papel na plasticidade hipocampal ^(40, 41). Outros autores ressaltam que a ERK desempenha importantes funções em diferentes tipos de LTP, tanto naquelas que dependem de NMDA como naquelas que independem deste receptor para acontecer, nas áreas CA1 e no giro denteado do hipocampo de mamíferos ⁽³⁸⁾.

Pesquisadores têm demonstrado que o treinamento no labirinto aquático de Morris ativa a MAPK nos neurônios de CA1 e CA2 do hipocampo dorsal. Entretanto, a inibição *in vivo* da cascata da MAPK/ERK prejudicou a memória espacial de longa duração, mas não a de curta duração ⁽⁴⁰⁾. De acordo com o funcionamento dessa proteína no crescimento e

diferenciação neuronal, este fato sugere que as camadas CA1 e CA2, em particular, podem ser locais de intensa plasticidade hipocampal associada à memória espacial de longa duração, embora os estudos a este respeito ainda necessitem de maiores investigações ^(38, 40).

O circuito primário da formação hipocampal baseia-se em uma série de sinapses sequenciais que transmitem informações desde o córtex entorrinal, células granulares do giro denteado, células piramidais CA3, Células piramidais CA1 que, por sua vez, se projetam de volta para a área entorrinal ⁽²³⁾. Isso forma o que é chamado o circuito hipocampal, que juntamente com a projeção de neurônios glutamatérgicos, GABAérgicos e os interneurônios serotoninérgicos da circuitaria local, representam o módulo de processamento básico na formação do hipocampo ⁽⁴²⁾.

Estudos sobre os mecanismos moleculares da memória nos neurônios sensoriais do molusco *Aplysia* mostrou que a sua indução pela serotonina envolve uma série de proteínas quinases, incluindo proteína quinase dependente de cAMP, proteína quinase C e proteína quinase ativada por AMPc (MAPK), as quais ativam a síntese de proteínas no neurônio pós-sináptico. Alguns segundos mensageiros como a proteína quinase A e MAPK, controlam a atividade de vários fatores de transcrição, incluindo a CREB (do inglês, “cAMP response element-binding protein”) ⁽⁴³⁾. Dessa forma ocorre a síntese de óxido nítrico (NO), que é transportado retrogradamente para o neurônio pré-sináptico, onde promoverá a liberação de mais glutamato. Um outro caminho para essa facilitação envolve o interneurônio serotoninérgico aumentando o potencial pós-sináptico excitatório entre as conexões sinápticas sensorio-motoras induzindo a facilitação ou processo de LTP ^(31, 44).

Entretanto, a memória não é adquirida na sua forma definitiva, é um processo gradual durante o qual uma nova informação se consolida e pode ser armazenada ou não nas áreas específicas do córtex cerebral. Dessa forma, de moluscos até os mamíferos, a memória pode ser dividida, quanto ao tempo, em pelo menos duas fases: uma independente da síntese de RNA, que dura de minutos a 1-3 horas (memória de curta duração, ou MCD) e uma que depende da síntese de RNA e proteína, ambos acontecendo no hipocampo, que perdura várias horas, dias, semanas ou até mesmo períodos mais longos (memória de longa duração (MLD) ^(45, 46)). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que permitem uma manutenção maior de uma MLD em função de outras.

Além do mais, a LTP é necessária para que haja a formação da memória, pois favorece uma dentre as três etapas do processo de memória, a consolidação, sendo as outras duas a aquisição e a evocação ⁽⁴⁷⁾. A aquisição, também conhecida como aprendizagem refere-se ao processo pelo qual as informações presentes no ambiente são

detectadas pelos sistemas sensoriais. Durante os primeiros minutos ou horas após o contato com o estímulo a ser memorizado, as informações recém - adquiridas tornam-se estáveis por meio de uma série de processos que envolvem síntese proteica e modificações sinápticas resultando na consolidação ⁽⁴⁸⁾. O termo consolidação foi apresentado há mais de 100 anos por Muller e Pilzecker (1900) para indicar que após a aprendizagem, a memória está inicialmente em um estado lábil, mas que ao longo do tempo se torna estável e resistente ⁽⁴⁵⁾. Entretanto, os mecanismos que envolvem a consolidação da memória só começaram a ser desvendados 70 anos depois. Em 1973, Timothy Bliss e Terje Lomo demonstraram em neurônios hipocâmpais de coelhos anestesiados que a estimulação elétrica de alta frequência num axônio pré-sináptico durante alguns segundos produz um aumento na magnitude da resposta pós-sináptica. Tal aumento pode durar horas, dias ou meses. Esse padrão de respostas reforçadas e persistentes ficou conhecido como LTP ⁽⁴⁷⁾. A consolidação da memória é o processo de formação de um “arquivo” de memória no sistema nervoso. Isto ocorre, nos neurônios hipocâmpais, muitas vezes com a participação concomitante do córtex parietal entorrinal e posterior complexo nuclear basolateral da amígdala ⁽³³⁾.

Alguns fatores neurotróficos, como a neurotrofina, o fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, “*brain derived neurotrophic factor*, BDNF) pode induzir também à LTP no hipocampo ⁽³⁾. O BDNF é um tipo de neurotrofina que é ativado pela proteína-quinase Ca^{++} calmodulina II (CaMKII) e desempenha importante papel na plasticidade sináptica, como por exemplo nos mecanismos de aprendizagem e memória. O BDNF, através da ligação ao receptor *TrkB*, regula a transmissão sináptica e promove a potenciação a longo prazo (LTP), através da modulação da expressão do receptor NMDA (N- metil D aspartato). Um estudo realizado com ratos machos wistar verificou a atuação do BDNF numa fase tardia da síntese de proteínas e de expressão de BDNF no hipocampo, 12 horas após a formação da consolidação da MCD os animais foram canulados. Após esse procedimento foi realizado um bloqueio na expressão do BDNF no hipocampo durante o processamento da MCD. Alguns testes comportamentais foram realizados, como os testes de esquila inibitória para observar a retenção da memória. Houve avaliação de 2, 4 ou 7 dias após o treinamento, todos os animais foram testados apenas uma vez quanto à memória de reconhecimento de objetos. Para a análise proteica do BDNF foi realizado *imunoblotting* e verificado que houve um déficit na persistência da memória nos animais, sem afetar na formação da MCD, indicando que a síntese de BDNF durante esta fase final de síntese de proteínas é crucial para a persistência do armazenamento da memória ⁽⁴⁶⁾.

Um outro grupo de pesquisa utilizou a exposição ao AE para camundongos machos durante 3 semanas e verificou que houve aumento na expressão proteica do BDNF no grupo AE, associado a um melhor desempenho no julgamento da plataforma escondida no labirinto aquático de Morris ⁽²⁹⁾. Estudos anteriores adotando modelos de exercício físico verificaram que houve aumento na expressão proteica do BDNF no grupo exercício físico, em que durante a atividade esportiva houve aumento nos níveis de RNAm do BDNF durante a fase inicial do processo de consolidação da memória ⁽³⁾.

Em contrapartida, outros fatores tais como o desequilíbrio nutricional, a exposição a agentes tóxicos ou a substâncias químicas ambientais durante o desenvolvimento do sistema nervoso podem aumentar a suscetibilidade ao risco de desenvolvimento de patologias associadas ao déficit de memória na vida adulta.

A Desnutrição e a Memória

O ambiente, particularmente o ambiente enriquecido, a dieta e a atividade física ⁽⁴²⁾, são fatores que podem modificar os aspectos genômicos e a programação metabólica ⁽⁴⁹⁾, por exemplo, pois insultos durante o período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso podem ter efeitos à longo prazo na memória ^(42, 49, 50). Atualmente, observa-se uma tendência mundial ao aumento no risco de desenvolvimento da obesidade não só devido ao genótipo, mas em virtude do comportamento alimentar e pouca mobilidade dos indivíduos ⁽⁴⁹⁾. Devido ao baixo poder aquisitivo da população bem como ao desconhecimento acerca da importância da ingestão de uma dieta equilibrada, a desnutrição ainda é um problema mundial que afeta milhões de nascituros e jovens durante as fases mais vulneráveis do desenvolvimento do sistema nervoso, principalmente em países subdesenvolvidos ⁽⁵¹⁾.

Embora muitas áreas do sistema nervoso sejam modificadas pela restrição materna de nutrientes, o hipocampo é uma estrutura seletivamente vulnerável a tal insulto ⁽⁵²⁾, em que a duração e a magnitude do insulto nutricional estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento corporal e a mudanças comportamentais no adulto ⁽⁵³⁾. A desnutrição nos períodos precoces da vida altera eventos maturacionais no sistema nervoso, o que pode resultar em anormalidades comportamentais e disfunções cognitivas, tais como na aprendizagem e memória ⁽⁴²⁾. Os efeitos da desnutrição e subnutrição são de contínuo interesse devido à incidência generalizada de deficiências nutricionais tanto fetal quanto infantil e às crescentes evidências de que os efeitos de insulto nutricional no desenvolvimento do cérebro são de longa duração e levam a permanentes déficits de aprendizagem e comportamento ⁽⁵⁴⁾. O termo "desnutrição" indica que, enquanto todos os

nutrientes necessários pelas espécies estão disponíveis na dieta, as quantidades são insuficientes ^(42, 53).

Desse modo, a inadequação nutricional altera o desenvolvimento do sistema nervoso, o qual inclui a síntese de componentes celulares, tais como ácidos nucleicos e proteínas, em paralelo à neurogênese e gliogênese, através da proliferação, diferenciação, migração e maturação celular, sendo a diferenciação acompanhada por um aumento no tamanho da célula ⁽⁵⁴⁾. Além do mais, pode alterar a atividade das enzimas e interferir na síntese de proteínas estruturais e, desse modo, também na incorporação de lipídios em várias estruturas do cérebro, o que pode acarretar modificações na progressão ordenada do desenvolvimento do cérebro, podendo comprometer a lógica e circuitos de memória ⁽⁴²⁾.

Estudos preliminares do nosso grupo utilizando ratos *Wistar*, em que um grupo com restrição alimentar recebeu 50% da dieta ofertada ao grupo controle durante a gestação e lactação, mostrou que 80% do desenvolvimento das células do DG do hipocampo ocorrem entre o nascimento e 21 dias de idade pós-natal e o processo continua ao longo da vida do animal. É possível desse modo, que os neurônios imaturos tenham uma maior susceptibilidade a danos causados pela restrição alimentar e indução de apoptose celular ⁽⁹⁾. Logo, fatores nutricionais ou ambientais que atuem em uma das fases do desenvolvimento podem levar a alterações permanentes que possivelmente refletem em déficit cognitivo, alterações emocional e comportamental ou posterior desenvolvimento de doenças degenerativas do sistema nervoso. Os mecanismos de indução de tais modificações neurocomportamentais podem envolver o neurônio ou a toxicidade de células progenitoras, desregulação endócrina e outros mecanismos provocados por fatores estressantes nutricionais ou a exposições tóxicas. Atualmente, mecanismos epigenéticos relacionados ao stress, má-nutrição e/ou agentes químicos ambientais têm sido implicados em animais e humanos, atuando no comportamento e/ou na função neuroendócrina; porém, a presença apenas de mecanismos epigenéticos é insuficiente para prever o desenvolvimento de doenças ⁽⁵⁵⁾.

Os fatores que podem interferir no mecanismo epigenético, tais como os ambientais ou nutricionais, ocorrem principalmente durante o período crítico do desenvolvimento, porque este é o momento em que aqueles promovem modificações devido à intensa plasticidade neural, característica desse período ⁽⁵⁶⁾. Porém, modificações advindas de efeitos epigenéticos são diferentes para cada tecido e podem se estender até a primeira infância e, talvez, na puberdade ou para além desta em alguns tecidos tais como os sistemas nervoso e reprodutor ⁽⁵⁷⁾. Há diferenças também entre os sexos e os efeitos na expressão do gene, além de um risco de obtenção de patologias ligadas a esses sistemas.

No entanto, tais mecanismos ainda precisam ser elucidados ⁽⁵⁵⁾. Por outro lado, há evidências de que a descendência de mães desnutridas tem uma expressão reduzida de fatores neurotróficos na formação do hipocampo comparada aos de mães controle alimentadas adequadamente ⁽⁹⁾.

Estudo anterior realizado com ratos machos *Sprague - Dawley*, que foram divididos em quatro grupos: controle, desnutrido, estado epilético e estado epilético e desnutrido investigou a relação entre a desnutrição pós-natal e/ou estados epiléticos no cérebro em desenvolvimento, como causas de danos no hipocampo. Foi realizado o teste de labirinto aquático de Morris e *Wersten Blot* e os resultados demonstraram que na idade adulta (80 dias de vida), tanto o grupo epilepsia quanto o desnutrido apresentaram déficits de aprendizagem espacial, perda de células do hipocampo e diminuição no nível de fosforilação da CREB na região CA1 do hipocampo ⁽⁵⁸⁾.

Um ponto a ser evidenciado em estudos sobre a relação da restrição calórica, neurogênese e a plasticidade sináptica, é que há habilidade do cérebro em resistir ao envelhecimento e restaurar a função após uma injúria ⁽⁵⁹⁾. Por outro lado, pesquisadores realizaram um estudo com ratos da linhagem *Sprague-Dawley* que tinham idade de 90 dias, onde os mesmos tiveram restrição alimentar de 50% comparados ao grupo controle durante a gestação e lactação ou apenas durante a lactação e observaram que o grupo com restrição alimentar durante a gestação e lactação apresentaram diminuição na proliferação e sobrevivência das células do DG do hipocampo, porém não houve modificação na diferenciação destas células hipocámpais ⁽¹¹⁾. Já outro estudo utilizando roedores com 70 dias de vida que tiveram restrição alimentar de 50% nos períodos pré e perinatal, observou uma diminuição na densidade das células NOS positivas na área CA1, CA3 e no DG do hipocampo ⁽⁵²⁾. Desse modo, tornam-se necessários estudos nessa área para elucidar os reais mecanismos pelos quais a restrição alimentar pode alternar a circuitaria hipocámpal.

Em contrapartida, um outro fator, o ambiente enriquecido (AE), tem efeitos sobre o sistema nervoso, incluindo o aumento nos níveis do fator neurotrófico BDNF ^(27, 60, 61), no número de espinhas dendríticas, alargamento das sinapses e aumento no número de neurônios recém gerados no giro denteado (DG) do hipocampo ^(25, 31, 62).

O Ambiente Enriquecido, a Memória e o BDNF

O AE é uma manipulação de habitação que aumenta os estímulos físico e social e tem sido demonstrado que o mesmo modula a plasticidade no hipocampo e em outras regiões corticais de roedores ^(27, 56, 63). Achados sugerem que o AE influencia no aprendizado

e memória, na eficácia da aquisição e retenção de novas tarefas ^(25, 64), aumenta o processo de neurogênese e pode facilitar a cognição e recuperação de lesões incluindo convulsões, isquemia e modelos de doença de Parkinson ⁽²⁷⁾. Uma hipótese é que a exposição ao AE provoca uma mudança induzida por aprendizagem na fisiologia sináptica no hipocampo, por exemplo, alterando a transmissão sináptica basal ou uma mudança na indução ou a persistência de LTP e LTD ⁽⁶⁵⁾. Um estudo utilizou ratas com 5 semanas e expostas ao AE durante 30 dias com a troca de utensílios sendo realizada a cada 2 semanas, em que os animais foram divididos em 4 grupos: controle, atividade física, Atividade Física (AF) + AE e AE, sendo realizados o teste de campo aberto e imunohistoquímica com fluorescência. Os resultados demonstraram que os grupos AE, AE+AF, AF apresentaram diminuição na distância percorrida no campo aberto, isto se devendo provavelmente a uma memória de habituação. Já nos grupos AE+AF houve um aumento na proliferação de células no DG do hipocampo e um maior número de neurônios e expressão de BDNF no hipocampo. Esses dados sugerem que os animais expostos ao AE+AF apresentaram um aumento na expressão gênica do *bdnf* e uma maior eficiência na memória de habituação ⁽⁶⁰⁾. Dessa forma, o BDNF participa do mecanismo da LTP na circuitaria hipocampal, o qual tem sido associado ao aumento na densidade das espinhas dendríticas e à forma e disponibilidade dos receptores nas sinapses ^(46, 66).

Além disso, estudos moleculares e celulares demonstraram que a exposição de animais ao AE resulta em mudanças anatomofisiológicas no cérebro, comparadas àqueles que vivem em condições padrão de habitação ⁽⁶⁰⁾. Essas mudanças incluem um aumento no peso total do cérebro, na quantidade do conteúdo de proteína e na espessura do córtex cerebral, sendo o hipocampo uma região que apresenta tais modificações ⁽²⁵⁾. Pode-se ressaltar também que o aumento na neurogênese devido à exposição ao AE acontece devido à integração desses novos circuitos funcionais de neurônios gerados e ao aumento no número de sinapses na via das fibras perfurantes no giro denteado e na região CA3-CA1 ⁽²⁵⁾.

Desse modo, a exposição de ratos adultos ao AE e exercício induzem à neurogênese no DG e estão correlacionados a uma elevação nos níveis de BDNF no hipocampo ⁽⁶⁷⁾. Um estudo utilizou camundongos machos controle ou expostos ao AE durante um período de 6 semanas e em seguida foi realizado o teste de memória de reconhecimento de objetos para verificar as memórias de curta e longa duração, o labirinto em cruz elevado para ansiedade e a imunohistoquímica. Os resultados demonstraram que o grupo AE apresentou aumento na proliferação celular no hipocampo, neurogênese no hipocampo dorsal, um maior percentual de tempo de exploração do objeto novo,

comprovando que houve MCD. Por conseguinte, houve maior percentual de entradas no braço aberto do labirinto, demonstrando que esses animais apresentam uma menor tendência em desenvolver ansiedade ⁽⁵⁾. Outra pesquisa utilizando ratos adultos (de 3-5 meses de idade) expostos ao AE durante 3 semanas com troca dos utensílios duas vezes por semana, foram divididos em dois grupos: controle e AE. Realizou-se os testes labirinto aquático de Morris, *immunoblotting* e eletrofisiologia e os resultados demonstraram que o grupo AE apresentou melhor desempenho no labirinto, aumento na expressão do fator de transcrição CREB e LTP na região CA1 do hipocampo. Um aumento na conectividade de rede e/ou a eficácia da amplificação de sinal nas sinapses estão entre as prováveis consequências de expor um animal a um ambiente enriquecido ⁽⁶²⁾.

Por outro lado, os estímulos provenientes do AE podem ainda aumentar a síntese de proteínas cinases e da proteína reguladora da expressão gênica, CREB, inibir as taxas de apoptoses espontâneas de células hipocâmpais e da amígdala, e induzir a expressão de moléculas de adesão de células neurais ⁽⁶⁸⁾. Outros estudos demonstraram que o AE aumenta a memória espacial e aumenta o número total de células positivas para CNPase no *corpus callosum* em ratas de meia-idade ⁽⁶⁹⁾.

A exposição ao AE tem efeitos positivos na função cerebral, incluindo aumento do número de dendritos, alargamento de sinapses e melhora da cognição. Mais recentemente, descobriu-se que o AE aumenta a sobrevivência de neurônios recém-formados no giro denteado (DG) do hipocampo ⁽⁷⁰⁾ e os níveis do BDNF ^(29, 60, 71). Fatores de crescimento neurotróficos contribuem ainda para o desenvolvimento de circuitos neurais centrais e periféricos e também regulam a neurogênese, sendo necessários durante o desenvolvimento para manter a viabilidade neuronal e orientar a formação da circuitaria sináptica ⁽⁷²⁾. Um grupo de estudo realizou pesquisa em camundongos machos com 90 dias de vida, os quais foram divididos em dois grupos: controle, AE aos 21 dias (1 semana, 4 semanas e 8 semanas) e AE aos 70 dias (4 semanas). Realizou-se o teste de campo aberto e foi verificado que os animais expostos ao AE durante 4 e 8 semanas apresentaram menor locomoção na tarefa do campo aberto e o grupo AE (4 semanas a partir de 70 dias) também apresentaram menor locomoção no campo aberto, porém, foi observado que o efeito persiste por mais tempo nos animais expostos por um período maior ao AE ⁽⁷³⁾. Já um outro estudo também realizado em camundongos com 90 dias de vida, verificou que tais animais expostos ao AE e agrupados apresentaram um aumento na neurogênese no DG do hipocampo verificado pela imunohistoquímica, além do AE proporcionar um melhor desempenho durante a realização da tarefa instrumental no condicionamento clássico ⁽²⁵⁾. Desse modo, embora tais dados contribuam, mostrando que a atividade física voluntária

pode regular os níveis de BDNF, RNAm, polipeptídeos codificados no hipocampo e também induzir à proliferação de células, por outro lado é necessário entender como os mecanismos funcionais induzidos pelo BDNF são realizados.

Dados sugerem que a expressão do *bdnf* no hipocampo adulto é necessária para a sobrevivência das células precursoras que foram induzidas por exercício, proliferação celular e desenvolvimento dendrítico ⁽²⁷⁾. A atividade de transcrição gênica do *bdnf* é induzida por diferença de potencial nos meios intra e extra-celular, iniciadas pelos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, os quais ativam os receptores NMDA ou sensíveis à voltagem Canais de Ca^{2+} . A este respeito, tem sido sugerido que a execução de exercício voluntário pode ativar receptores NMDA no hipocampo, o qual pode aumentar a expressão de *bdnf* ⁽⁶²⁾.

O AE favorece outros aspectos percepto - cognitivos e sociais, incluindo o aumento da oportunidade de aprendizagem, socialização além da realização de exercício físico ^(31, 60, 74). Outros pesquisadores identificaram ainda que a exposição de ratos ao AE acelera o desenvolvimento do córtex visual ⁽²⁸⁾, bem como modula o controle hedônico de preferência ao doce, mesmo em animais expostos ao AE e ao stress ⁽⁷⁵⁾. É bem estabelecido também que o AE pode induzir a alterações na plasticidade neural de animais intactos e pós-lesão, incluindo tanto modificações morfológicas como comportamentais ^(76, 77). O AE pode ainda melhorar o desempenho dos animais em diferentes aspectos de aprendizagem e tarefas de memória que envolvam o funcionamento do hipocampo ^(5, 30, 62). O AE também está relacionado à reestruturação de regiões do sistema nervoso, incluindo a associação entre o córtex e o hipocampo. Portanto, o AE pode promover a sobrevivência da célula por meio de mecanismos que estão envolvidos nesta reorganização também cortical ⁽³¹⁾.

Estudo realizado anteriormente com ratos machos *wistar*, aos 90 dias de vida, expostos durante 3 semanas ao AE e com troca semanal do objetos, observou que dentre os quatro grupos experimentais: sedentário, sedentário com AE, exercício com AE e exercício, o grupo exercício com AE apresentou memória de curta duração. No grupo exercício houve aumento na expressão do RNAm do *bdnf* do hipocampo e na tarefa de campo aberto houve habituação ao ambiente em todos os grupos; já a imunohistoquímica demonstrou um maior número de células BrdU positivas com exercício, mas não com AE ⁽⁶¹⁾. Em contrapartida, outros pesquisadores utilizando camundongos fêmeas verificaram em seus estudos que os animais expostos à roda de corrida apresentaram indução na neurogênese no DG do hipocampo que persistiu na ausência de atividade física, porém, o grupo exposto à roda de corrida e AE apresentou um aumento significativo na neurogênese no DG quando comparado ao exercício e AE isolados ⁽⁷⁸⁾.

Já a atividade locomotora aumentada no AE está associada a um incremento no volume de sangue cerebral pelo aumento do fluxo sanguíneo, maior permeabilidade da barreira hematoencefálica, aumento da angiogênese e uma maior utilização de glicose pelos neurônios ^(31, 78). A atividade locomotora também é acompanhada por um aumento substancial na circulação hormonal e fatores de crescimento. No entanto, no teste de campo aberto para avaliação da distância percorrida pelos animais expostos ao AE, estudos identificaram que houve diminuição da distância percorrida, provavelmente isso se devendo a uma rápida habituação durante a realização desta tarefa ^(60, 73, 76), ou esse teste não poderia captar tais mudanças.

A Desnutrição, o Ambiente Enriquecido e a Memória

As deficiências nutricionais decorrentes da insuficiente ingestão de macro e/ou micronutrientes levam a graus variáveis de desnutrição, reconhecidamente um grave problema mundial principalmente nos países em desenvolvimento. No que se refere ao sistema nervoso central, a deficiência nutricional no início da vida é mais grave, principalmente porque nesta fase o crescimento e o desenvolvimento desse sistema estão ocorrendo com grande intensidade, através dos processos de hiperplasia, hipertrofia e mielinização ⁽⁷⁹⁾. Desse modo, esse momento é considerado como um dos períodos críticos mais importantes para o desenvolvimento do SN, por ser uma etapa de grande vulnerabilidade a vários tipos de agressão, inclusive a nutricional ⁽⁴²⁾.

Em contrapartida, o AE surge como uma alternativa de remodelação dos efeitos da desnutrição precoce nos mecanismos de memória no indivíduo adulto, porém, poucos estudos têm demonstrado tais efeitos. Dados que foram obtidos em 1972, utilizou ratos *Wistar*, em que durante a gestação e lactação suas genitoras receberam dieta caseína 25% (grupo controle) ou dieta caseína 12% (grupo desnutrido). Aos 21 dias os animais foram afastados de suas genitoras e colocados em gaiolas isoladas ou expostos ao AE durante 1h por dia (5 vezes na semana) durante 7 semanas. Foi realizado o teste de campo aberto e os resultados demonstraram que os animais desnutridos e acondicionados em gaiolas - padrão apresentaram maior locomoção em tal tarefa. Um teste para observar o interesse dos animais em explorar novo ambiente foi utilizado: um quarto pequeno (25,5 cm por 23 cm) foi construído adjacente ao campo aberto e interligados através de uma abertura de 12 cm. Os animais foram colocados individualmente em um campo aberto por um período de 55 minutos. A percentagem dos animais de cada grupo que entrou no "novo espaço" foi

contabilizada e os resultados demonstraram que os animais desnutridos precocemente e expostos ao AE apresentaram maior número de entradas no ambiente novo ⁽⁸⁰⁾.

Conclusões

Tais evidências da literatura científica sugerem que os mecanismos de plasticidade sináptica no hipocampo de animais adultos são influenciados pelo AE. O BDNF atua como um fator regulador na sobrevivência e desenvolvimento de células precursoras neuronais dendríticas no hipocampo de animais adultos e mais importante ainda, a proliferação celular induzida pelo exercício pode ser promovida pelo aumento na expressão do *bdnf*. Resultados sugerem que fatores ambientais podem influenciar diretamente no processo de memória; desse modo, será que o AE consegue reverter os efeitos da desnutrição sobre o funcionamento do hipocampo em ratos adultos que sofreram um processo de desnutrição proteica em períodos precoces da vida? Ao nosso conhecimento não existem até o momento estudos que correlacionem os efeitos de reversão da desnutrição pelo AE sobre o funcionamento do hipocampo especificamente, de forma que a explicação de como o AE atua prevenindo ou mesmo revertendo os efeitos deletérios da desnutrição é ainda questionado.

Estudos moleculares e comportamentais têm demonstrado que quando esses animais são submetidos, durante o seu desenvolvimento, a um ambiente "rico" em estímulos e/ou a sessões de estimulação ambiental, há um aumento no peso e espessura de estruturas corticais e subcorticais, na atividade de enzimas neuronais, no número e diâmetro dos capilares corticais e diminuição na densidade celular, em comparação com animais criados em ambientes "pobres". O aumento no número de contatos sinápticos e ramificações dendríticas encontrados nesses animais evidenciam também plasticidade sináptica aumentada.

Dessa maneira, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos nos âmbitos molecular, celular e comportamental a fim de investigar se o AE pode reverter os efeitos da desnutrição sobre o funcionamento do hipocampo adulto naqueles animais que foram desnutridos precocemente. Assim, a investigação dos mecanismos pelos quais a neuroplasticidade possa facilitar a recuperação de desnutridos é fundamental para que o tratamento destes seja direcionado adequadamente.

Os processos adaptativos de plasticidade do sistema nervoso fornecem suporte para que sejam implementadas estratégias para facilitação da recuperação psicossocial de indivíduos ou pequenos grupos de indivíduos anteriormente desnutridos, e portanto para sua

reinserção em ambientes mais enriquecidos do que aqueles de onde vieram. O fato de diferentes regiões do sistema nervoso serem mais ou menos susceptíveis à estimulação sensório-motora, certamente permitirá condutas específicas para a obtenção de melhores resultados terapêuticos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Furini CR, Myskiw JC, Benetti F, Izquierdo I. New frontiers in the study of memory mechanisms. *Rev Bras Psiquiatr.* 2013;35(2):173-7. Epub 2013/08/02.
2. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory.* 1997;68(3):285-316. Epub 1997/12/17.
3. Ma YL, Wang HL, Wu HC, Wei CL, Lee EH. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *Neuroscience.* 1998;82(4):957-67. Epub 1998/02/18.
4. Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, et al. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 2004;28(3):273-83. Epub 2004/07/01.
5. Tanti A, Rainer Q, Minier F, Surget A, Belzung C. Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Neuropharmacology.* 2012;63(3):374-84. Epub 2012/05/09.
6. Moser E, Moser MB, Andersen P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1993;13(9):3916-25. Epub 1993/09/01.
7. Cintra L, Diaz-Cintra S, Galvan A, Kemper T, Morgane PJ. Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. *Brain Res.* 1990;532(1-2):271-7. Epub 1990/11/05.
8. Stead JD, Neal C, Meng F, Wang Y, Evans S, Vazquez DM, et al. Transcriptional profiling of the developing rat brain reveals that the most dramatic regional differentiation in gene expression occurs postpartum. *J Neurosci.* 2006;26(1):345-53. Epub 2006/01/10.
9. Jahnke S, Bedi KS. Undernutrition during early life increases the level of apoptosis in the dentate gyrus but not in the CA2+CA3 region of the hippocampal formation. *Brain research.* 2007;1143:60-9. Epub 2007/02/27.
10. Coupe B, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Lefevre F, Mairesse J, Dickes-Coopman A, et al. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *Journal of neuroendocrinology.* 2009;21(1):40-8. Epub 2008/12/20.

11. Matos RJ, Orozco-Solis R, Lopes de Souza S, Manhaes-de-Castro R, Bolanos-Jimenez F. Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. *Neuroscience*. 2011;196:16-24. Epub 2011/09/21.
12. Cintra L, Granados L, Aguilar A, Kemper T, DeBassio W, Galler J, et al. Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus*. 1997;7(2):184-91. Epub 1997/01/01.
13. Valadares CT, de Sousa Almeida S. Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water-maze. *Nutr Neurosci*. 2005;8(1):39-47. Epub 2005/05/25.
14. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*. 1997;17(7):2492-8. Epub 1997/04/01.
15. Risedal A, Mattsson B, Dahlqvist P, Nordborg C, Olsson T, Johansson BB. Environmental influences on functional outcome after a cortical infarct in the rat. *Brain research bulletin*. 2002;58(3):315-21. Epub 2002/07/20.
16. Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *The European journal of neuroscience*. 2006;24(7):1850-6. Epub 2006/10/17.
17. Cutuli D, Rossi S, Burello L, Laricchiuta D, De Chiara V, Foti F, et al. Before or after does it matter? Different protocols of environmental enrichment differently influence motor, synaptic and structural deficits of cerebellar origin. *Neurobiology of disease*. 2011;42(1):9-20. Epub 2010/12/25.
18. Gobbo OL, O'Mara SM. Combining exercise and cyclooxygenase-2 inhibition does not ameliorate learning deficits after brain insult, despite an increase in BDNF levels. *Brain research*. 2005;1046(1-2):224-9. Epub 2005/05/12.
19. Hopkins ME, Bucci DJ. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*. 2010;94(2):278-84. Epub 2010/07/06.
20. Falkenberg T, Ernfors P, Persson H, Lindefors N. Cortical transynaptic activation of tyrosine kinase receptor trkB messenger RNA expression in rat hippocampus. *Neuroscience*. 1992;51(4):883-9. Epub 1992/12/01.
21. Pietropaolo S, Branchi I, Cirulli F, Chiarotti F, Aloe L, Alleva E. Long-term effects of the periadolescent environment on exploratory activity and aggressive behaviour in mice:

- social versus physical enrichment. *Physiology & behavior*. 2004;81(3):443-53. Epub 2004/05/12.
22. Eckert MJ, Abraham WC. Physiological effects of enriched environment exposure and LTP induction in the hippocampus in vivo do not transfer faithfully to in vitro slices. *Learn Mem*. 2010;17(10):480-4. Epub 2010/09/24.
 23. Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature reviews Neuroscience*. 2008;9(1):65-75. Epub 2007/12/21.
 24. Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural brain research*. 2011;222(1):246-64. Epub 2011/04/21.
 25. Madronal N, Lopez-Aracil C, Rangel A, del Rio JA, Delgado-Garcia JM, Gruart A. Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. *PloS one*. 2010;5(6):e111130. Epub 2010/06/19.
 26. Christie BR, Eadie BD, Kannangara TS, Robillard JM, Shin J, Titterness AK. Exercising our brains: how physical activity impacts synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Neuromolecular medicine*. 2008;10(2):47-58. Epub 2008/06/07.
 27. Williamson LL, Chao A, Bilbo SD. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain, behavior, and immunity*. 2012;26(3):500-10. Epub 2012/01/28.
 28. Prusky GT, Reidel C, Douglas RM. Environmental enrichment from birth enhances visual acuity but not place learning in mice. *Behavioural brain research*. 2000;114(1-2):11-5. Epub 2000/09/21.
 29. Kondo M, Takei Y, Hirokawa N. Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. *Neuron*. 2012;73(4):743-57. Epub 2012/03/01.
 30. Birch AM, McGarry NB, Kelly AM. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus*. 2013;23(6):437-50. Epub 2013/03/06.
 31. Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus*. 2006;16(3):250-60. Epub 2006/01/18.

32. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*. 2001;24:677-736. Epub 2001/08/25.
33. Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural brain research*. 1999;103(1):1-11. Epub 1999/09/04.
34. Riedel G, Micheau J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2001;25(4):835-53. Epub 2001/06/01.
35. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual review of neuroscience*. 2000;23:649-711. Epub 2000/06/09.
36. Zagrebelsky M, Korte M. Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses. *Neuropharmacology*. 2013. Epub 2013/06/12.
37. Morris RGM, Davis S, Butcher SP. Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors: a role in information storage? *Philos Trans R Soc London Ser*. 1990;329:187–204.
38. Adams JP, Sweatt JD. Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2002;42:135-63. Epub 2002/01/25.
39. McHugh TJ, Blum KI, Tsien JZ, Tonegawa S, Wilson MA. Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell*. 1996;87(7):1339-49. Epub 1996/12/27.
40. Blum S, Moore AN, Adams F, Dash PK. A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(9):3535-44. Epub 1999/04/23.
41. Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*. 2004;116(3):467-79. Epub 2004/03/16.
42. Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2002;26(4):471-83. Epub 2002/09/03.
43. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 2001;294(5544):1030-8. Epub 2001/11/03.
44. Nikitin VP. A new mechanism of synapse-specific neuronal plasticity. *Neuroscience and behavioral physiology*. 2007;37(6):559-70. Epub 2007/07/28.

45. Alonso M, Vianna MR, Depino AM, Mello e Souza T, Pereira P, Szapiro G, et al. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*. 2002;12(4):551-60. Epub 2002/08/31.
46. Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(7):2711-6. Epub 2008/02/12.
47. da Silveira CK, Furini CR, Benetti F, Monteiro Sda C, Izquierdo I. The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*. 2013;103:64-71. Epub 2013/04/16.
48. Igaz LM, Winograd M, Cammarota M, Izquierdo LA, Alonso M, Izquierdo I, et al. Early activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in the hippocampus is required for short-term memory formation of a fear-motivated learning. *Cellular and molecular neurobiology*. 2006;26(4-6):989-1002. Epub 2006/09/16.
49. Maurage C. Children's nutrition and health in adulthood. *Appetite*. 2008;51(1):22-4. Epub 2008/04/09.
50. Patel MS, Srinivasan M. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. *The Journal of nutrition*. 2010;140(3):658-61. Epub 2010/01/29.
51. Barros KM, Manhaes-De-Castro R, Lopes-De-Souza S, Matos RJ, Deiro TC, Cabral-Filho JE, et al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutritional neuroscience*. 2006;9(1-2):99-104. Epub 2006/08/17.
52. Zhang Y, Li N, Yang Z. Perinatal food restriction impaired spatial learning and memory behavior and decreased the density of nitric oxide synthase neurons in the hippocampus of adult male rat offspring. *Toxicology letters*. 2010;193(2):167-72. Epub 2010/01/19.
53. Laus MF, Vales LD, Costa TM, Almeida SS. Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies. *International journal of environmental research and public health*. 2011;8(2):590-612. Epub 2011/05/11.
54. Georgieff MK. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(2):614S-20S. Epub 2007/02/08.
55. Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environmental health : a global access science source*. 2012;11:42. Epub 2012/06/22.

56. Covic M, Karaca E, Lie DC. Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. *Heredity*. 2010;105(1):122-34. Epub 2010/03/25.
57. Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ, Barbieri MA. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *Jornal de pediatria*. 2007;83(6):494-504. Epub 2007/12/13.
58. Huang LT, Lai MC, Wang CL, Wang CA, Yang CH, Hsieh CS, et al. Long-term effects of early-life malnutrition and status epilepticus: assessment by spatial navigation and CREB(Serine-133) phosphorylation. *Brain research Developmental brain research*. 2003;145(2):213-8. Epub 2003/11/08.
59. Gillette-Guyonnet S, Vellas B. Caloric restriction and brain function. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2008;11(6):686-92. Epub 2008/10/02.
60. Kobil T, Liu QR, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem*. 2011;18(9):605-9. Epub 2011/09/01.
61. Bechara RG, Kelly AM. Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behavioural brain research*. 2013;245:96-100. Epub 2013/02/27.
62. Huang FL, Huang KP, Wu J, Boucheron C. Environmental enrichment enhances neurogranin expression and hippocampal learning and memory but fails to rescue the impairments of neurogranin null mutant mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(23):6230-7. Epub 2006/06/10.
63. Lindsey BW, Tropepe V. A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Progress in neurobiology*. 2006;80(6):281-307. Epub 2007/01/16.
64. Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, et al. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(21):5217-24. Epub 2005/05/27.
65. Eckert MJ, Bilkey DK, Abraham WC. Altered plasticity in hippocampal CA1, but not dentate gyrus, following long-term environmental enrichment. *Journal of neurophysiology*. 2010;103(6):3320-9. Epub 2010/04/16.
66. Bekinschtein P, Oomen CA, Saksida LM, Bussey TJ. Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Seminars in cell & developmental biology*. 2011;22(5):536-42. Epub 2011/07/20.

67. Choi SH, Li Y, Parada LF, Sisodia SS. Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF. *Molecular neurodegeneration*. 2009;4:52. Epub 2009/12/23.
68. Williams BM, Luo Y, Ward C, Redd K, Gibson R, Kuczaj SA, et al. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiology & behavior*. 2001;73(4):649-58. Epub 2001/08/10.
69. Zhao YY, Shi XY, Qiu X, Zhang L, Lu W, Yang S, et al. Enriched environment increases the total number of CNPase positive cells in the corpus callosum of middle-aged rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2011;71(3):322-30. Epub 2011/11/10.
70. Mesa-Gresa P, Perez-Martinez A, Redolat R. Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. *Aggressive behavior*. 2013;39(4):269-79. Epub 2013/04/17.
71. Jurgens HA, Johnson RW. Environmental enrichment attenuates hippocampal neuroinflammation and improves cognitive function during influenza infection. *Brain, behavior, and immunity*. 2012;26(6):1006-16. Epub 2012/06/13.
72. Fargali S, Sadahiro M, Jiang C, Frick AL, Indall T, Coglian V, et al. Role of neurotrophins in the development and function of neural circuits that regulate energy homeostasis. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2012;48(3):654-9. Epub 2012/05/15.
73. Amaral OB, Vargas RS, Hansel G, Izquierdo I, Souza DO. Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiology & behavior*. 2008;93(1-2):388-94. Epub 2007/10/24.
74. Kempermann G, Fabel K, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Garthe A, et al. Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. *Frontiers in neuroscience*. 2010;4:189. Epub 2010/12/15.
75. Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K, Manji HK, Herkenham M. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Molecular psychiatry*. 2010;15(12):1152-63. Epub 2010/03/24.
76. Zhu SW, Codita A, Bogdanovic N, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, et al. Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice. *Behavioural brain research*. 2009;197(2):339-46. Epub 2008/10/28.
77. Hicks RR, Zhang L, Atkinson A, Stevenon M, Veneracion M, Seroogy KB. Environmental enrichment attenuates cognitive deficits, but does not alter neurotrophin gene expression in the hippocampus following lateral fluid percussion brain injury. *Neuroscience*. 2002;112(3):631-7. Epub 2002/06/21.

78. Fabel K, Wolf SA, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Kempermann G. Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Frontiers in neuroscience*. 2009;3:50. Epub 2009/01/01.
79. Monteiro JS, Guedes RCA, de Castro RM, Filho JEC. Psychosocial stimulation and brain plasticity in malnourished individuals. *Rev bras saúde matern infant*. 2002;1:15-22. Epub jan. - abril, 2002.
80. Levitsky DA, Barnes RH. Nutritional and environmental interactions in the behavioral development of the rat: long-term effects. *Science*. 1972;176(4030):68-71. Epub 1972/04/07.

CAPÍTULO 3

3.1 Objetivo, Materiais e Métodos do Artigo Original

3.1.1 Objetivo

Avaliar o efeito do ambiente enriquecido sobre a plasticidade sináptica no hipocampo de ratos adultos que foram submetidos à desnutrição no período perinatal.

3.1.2 Materiais e métodos

Animais, dieta e ambiente enriquecido

Foram utilizados ratos albinos da linhagem *Wistar*, com idades entre 0 e 90 dias provenientes da colônia do Departamento de Nutrição e mantidos no biotério de experimentação do anexo de anatomia, ambos pertencentes à Universidade Federal de Pernambuco. As fêmeas nulíparas com peso entre 250 e 300 g foram mantidas em Biotério de experimentação com temperatura de 22°C ($\pm$ 2°C), claro - escuro de 12-12h, ciclo invertido e livre acesso à água e dieta padrão do biotério (Presence®). Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo 23076.018667/2012).

Foram realizados acasalamentos na proporção de duas fêmeas para um macho e no momento em que foi detectada a gestação as mesmas foram divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais de acordo com a dieta fornecida durante a gestação e lactação: controle (C, Caseína 17%, n= 4), desnutrido (D, Caseína 8%, n= 4) (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993).

Conteúdo da dieta normoproteica e hipoproteica

As dietas confeccionadas no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco são isocalóricas com alteração apenas no conteúdo de proteína (Reeves et al., 1993), ver Tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas à base de caseína (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993).

Ingredientes	Quantidade /kg de dieta	
	<i>Dieta hipoproteica</i> (8% de caseína)	<i>Dieta normoproteica</i> (17% de caseína)
Caseína	79,30g	179,3g
Mix de vitamina*	10,00g	10,00g
Mix de sais minerais†	35g	35g
Celulose	50g	50g
Bitartarato de colina	2,5g	2,5g
DL-metionina	3,0g	3,0g
Óleo de soja	70ml	70ml
Amido	750,2g	650,2g

* Mistura de vitaminas contendo (em mg.kg⁻¹ de dieta): retinol,12; colecalciferol, 0,125; tiamina, 40; riboflavina, 30; ácido pantotênico,140; piridoxina, 20; inositol, 300; cianocobalamina, 0,1; menadiona, 80; ácido nicotínico, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; ácido p-aminobenzóico, 100; e biotina, 0,6.

† Mistura mineral contendo (em mg.kg⁻¹de dieta): CaHPO₄, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄.7H₂O, 200; e elementos-traço, 400(MnSO₄.H₂O, 98; CuSO₄.5H₂O, 20; ZnSO₄.7H₂O, 80; CoSO₄.7H₂O, 0,16; e KI, 0,32; com amido suficiente para completar 40g [por kg de dieta].

O dia de nascimento da ninhada foi considerado o zero e a manipulação para redução da ninhada foi realizada no 1º dia de vida, onde apenas os filhotes machos foram utilizados nesse experimento. Após a separação, cada ninhada foi constituída de oito ratos machos e no 25º dia de vida os animais provenientes de cada grupo foram desmamados (Ost'adalova e Babicky, 2012), receberam dieta Presence® *ad libitum* e subdivididos de acordo com a condição nutricional e a exposição ao ambiente enriquecido (AE) em: controle com ambiente enriquecido (CAE, n=16); controle sem ambiente enriquecido (CSAE, n= 16);

desnutrido com ambiente enriquecido (DAE, n=16); desnutrido sem ambiente enriquecido (DSAE, n=16). Foram colocados em média 8 animais por gaiola do AE para minimizar os efeitos do estresse e possível agressão entre eles. Ver figura 8.

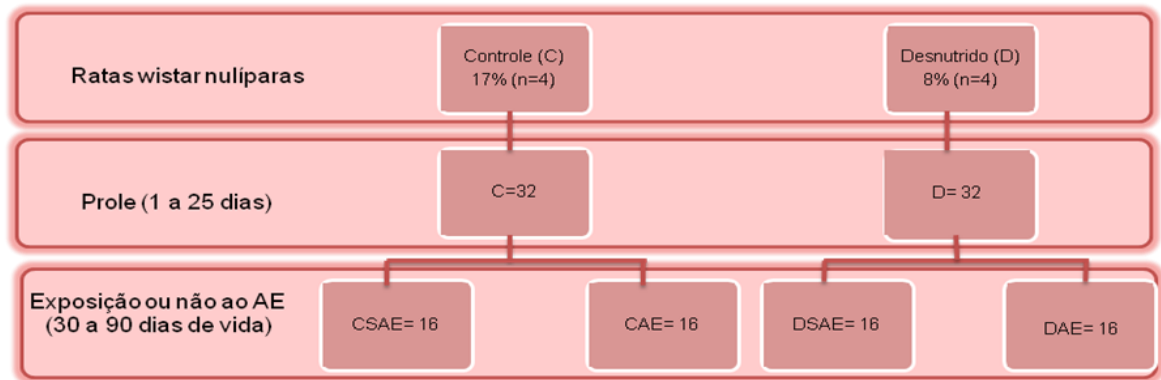


Figura 3.1: Desenho experimental do estudo.

A exposição ao AE foi realizada da idade de 30 até 90 dias de vida em gaiolas que obedeceram as seguintes dimensões: 61 cm x 44 cm x 63 cm (Largura x profundidade x altura). Foram utilizadas escadas, tubos de plástico, túneis, suportes para escalar na posição vertical, bolas, bonecos e casas de plástico. Os brinquedos foram trocados e/ou rearranjados a cada 5 dias para nova estimulação, minimizando os efeitos da habituação (Beauquis *et al.*, 2010). Ver figuras 3.2 A e B.



A)



B)

Figuras 3.2: A e B Gaiolas do Ambiente Enriquecido. Dimensões: 61 x 44 x 63 cm (Largura x profundidade x altura).

Análise molecular

Análise da Expressão Gênica do *bdnf* e *Trkb*

PCR em tempo real

Aos 90 dias de vida, os animais foram decapitados às 7h da manhã, no início do ciclo escuro, em que começa o período de maior atividade dos roedores. Os crânios foram imediatamente dissecados e os encéfalos rapidamente congelados em gelo seco e armazenados num freezer -80°C. O experimento de PCR em tempo real foi realizado nas amostras de hipocampo seguindo as etapas descritas resumidamente a seguir. O RNA total foi extraído utilizando 1 ml do reagente Trizol (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) com um homogeneizador (Pellet Pestle with Cordless Motor, Fisher Scientific, EUA). O RNA total foi isolado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante Invitrogen[®] e, subsequentemente, a quantidade e qualidade do RNA purificado foi avaliado utilizando-se o espectrofotômetro, NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, as amostras de RNA foram tratadas com tampão de gDNA Wipeout (Qiagen[®], Hilden, Alemanha) para remover eficazmente a contaminação do DNA genômico durante 2 min a 42 ° C, e armazenados em gelo. Posteriormente, foi realizada a transcrição reversa de 2,0 µg de RNA purificado, utilizando o kit de transcrição reversa QuantiTect (Qiagen[®], Hilden, Alemanha), a 42°C durante 15 min. A enzima foi inativada a 95°C durante 3 minutos em um volume total de 20 µl de água livre de RNase. A preparação de cDNA foi, em seguida, armazenada a -20°C até a sua utilização. Posteriormente, 5 µl de cada amostra diluída de cDNA foi utilizada como *template* para a amplificação por PCR utilizando SYBR Green (Qiagen[®], Hilden, Alemanha), como fluoróforo intercalante. Utilizou-se o sistema de detecção de PCR em tempo real: Rotor Gene HRM-2Plex (Qiagen[®], Hilden, Alemanha). Os parâmetros do PCR foram: o primeiro passo de desnaturação inicial de 5 min a 95°C seguido de 45 ciclos de 5s a 95°C, e 10 s a 60°C. Os iniciadores utilizados para a amplificação estão apresentados na tabela 1.

Tabela 2. Sequências de *primers* desenhados para estudo de PCR em tempo real dos genes: *bdnf*, *trkb* e do gene constitutivo de referência *gapdh*.

Primer	Forward	Reverse
<i>bdnf</i>	5'-TCAGATCTCTTCTGTGTGCGT GAGT-3'	5'- GGAGATCTCTCTGTTCCTT CAGCAA-3'
<i>trkb</i>	5'-GCCATCAGCACCAAGCAGCAAGAG-3'	5'-GAAGCCCAAGACCAGCAAGCATAAGC-3'
<i>gapdh</i>	5'-GCGAGATCCCGTCAAGATCA-3'	5'-CCACAGTCTTCTGAGTGGCAG-3'

Os valores limites de ciclo (do inglês, “*cycle threshold*”, CT) das amostras foram determinados pela normalização a partir das curvas de fluorescência *versus* o número de ciclos do PCR durante a amplificação exponencial. As curvas padrão para todas as amplificações dos *primers* (ou oligonucleotídeos) foram geradas traçando os valores médios dos valores de CT em função do logaritmo da quantidade de moléculas *template* (molde) alvo. Todas as quantificações foram normalizadas para o gene de referência (ou *house-keeping*): *desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato* (GAPDH). O valor da quantificação relativa de cada gene alvo foi analisado utilizando um método CT comparativo (Livak e Schmittgen, 2001). A seguinte fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi usada para calcular a quantidade relativa do transcrito na amostra e normalizado com o de referência endógena GAPDH: $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre a CT no gene de interesse e GAPDH, e $\Delta\Delta CT$ para a amostra é igual à média do ΔCT da amostra menos a média do ΔCT da amostra de controle sem exposição ao ambiente (utilizada como calibração).

Avaliação dos Indicadores Somáticos

O peso corporal e o comprimento nasoanal dos animais entre 1 e 60 dias de vida foram semanalmente acompanhados, sendo o peso corporal mensurado em balança eletrônica digital (Marte[®], modelo S-1000, capacidade de 1kg e sensibilidade de 0,1g). O comprimento naso-anal foi verificado através de papel milimetrado e a partir dos dados de peso (g) e comprimento (cm), foi calculado o Índice de Massa Corporal (IMC). Após a idade de 60 dias apenas o peso corporal dos animais continuou sendo registrado semanalmente.



A)



B)

Figuras 3.3: A) Balança eletrônica digital (Marte[®], modelo S-1000) e B) mensuração do comprimento naso anal com papel milimetrado e fita métrica.

Avaliação comportamental

Teste de ansiedade experimental

O teste para avaliação da ansiedade foi realizado nos animais com a idade de 60 dias no horário das 12 horas e utilizado o modelo do labirinto em cruz elevado baseado em (Pellow *et al.*, 1985), o qual é constituído de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) se estendendo a partir de uma plataforma central comum (10x10cm) com piso e paredes escuros, elevado a uma altura de 50 cm a partir do nível do piso e iluminado sob uma luz vermelha de baixa voltagem (15 w) acima da área central. Este modelo experimental é baseado em procedimentos realizados por Montgomery 1955, no medo inato que os roedores têm pelo espaço aberto e elevado, preferindo ficar nos braços fechados.

A realização do teste consistiu em colocar os animais individualmente no espaço central do aparelho com a cabeça voltada para o braço fechado e posterior filmagem durante 5 min. Os registros foram realizados através de imagens por câmera com sistema infravermelho e armazenados em computador. Três observadores cegos visualizaram os filmes e registraram em protocolo o tempo de permanência em cada braço. O registro de cada entrada teve validade a partir do momento em que o animal encontrou-se com as 4 patas em um dos braços do labirinto. O tempo de cada animal foi marcado através de um cronômetro digital, onde o tempo de permanência nos braços abertos foi utilizado como índice de ansiedade.



Figura 3.4: Labirinto em cruz elevado utilizado para realização do teste de ansiedade.

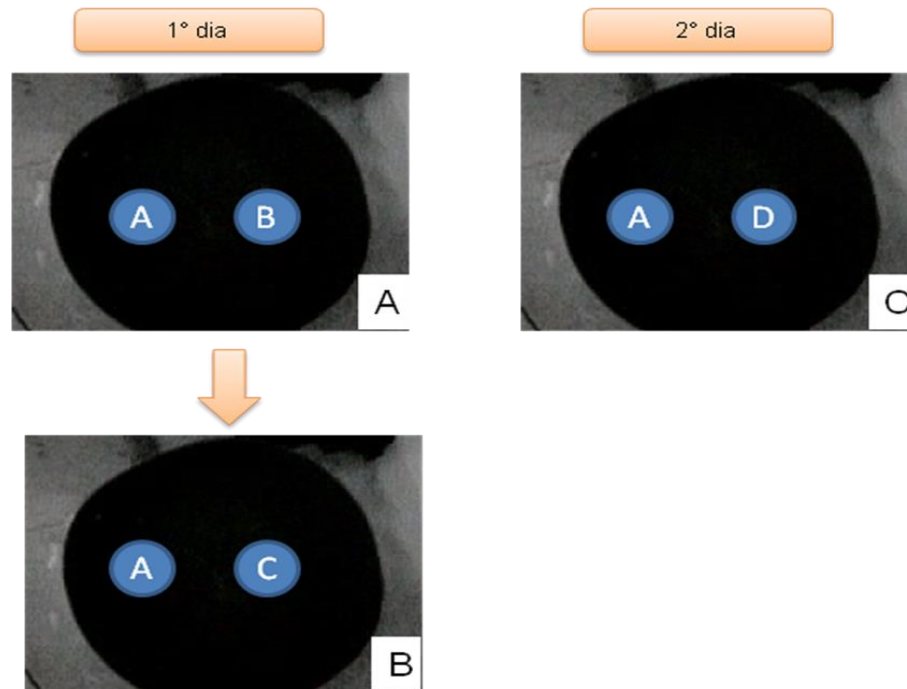
Memória de reconhecimento de objetos (RO) no campo aberto

Na tarefa de reconhecimento de objetos foi observado e avaliado o comportamento exploratório dos animais (Ennaucer and Delacour, 1988), em que os mesmos foram submetidos à tarefa de campo aberto a partir dos 85 dias de vida, o qual consistiu de um aparato circular (1 m de diâmetro), delimitado por paredes com 30cm de altura e confeccionado em etileno vinil acetato (E.V.A.) com 1 cm de espessura e na cor preta. Uma superfície macia de E.V.A. também preta, foi colocada no fundo do campo aberto para facilitar o movimento do animal e proporcionar um maior contraste entre este e a superfície. As bases foram trocadas e limpas com etanol a 70% a cada utilização para diminuir os possíveis odores restantes. A utilização de uma câmera de infravermelhos é importante porque permite a realização de experimentos com animais durante a fase escura do ciclo. Foram contabilizados os números de bolos fecais e a presença de urina. Todos os animais foram habituados ao ambiente do teste durante 3 dias a partir dos 85 dias de vida, tendo 20 minutos por dia para livre exploração do aparato na ausência de objetos. Os testes foram realizados às 7 horas da manhã, início do ciclo escuro, momento em que os animais estão em maior atividade.

Os objetos feitos de vidro foram colocados na arena nos próximos 2 dias, em que foram utilizados para a avaliação da atividade exploratória e locomotora. No primeiro dia (sessão de treino) os animais foram colocados na arena contendo dois objetos diferentes (A e B) para livre exploração por 5 minutos. O teste foi repetido 180 minutos depois para testar a memória de curta duração (MCD) e 24 horas após o treino para testar a memória de longa duração (MLD). Nos períodos dos testes, um dos objetos foi substituído por um novo objeto (C, para MCD ou D, para MLD) e o rato foi recolocado na arena por mais 5 minutos. Ver

figuras 3.5 A, B e C.

As posições dos objetos (familiar ou novo) foram randomizadas e a arena foi limpa entre os testes. A exploração foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz e/ou as patas dianteiras. Sentar ou andar em torno do objeto não foi considerado comportamento exploratório. O tempo gasto explorando cada objeto foi marcado por três observadores cegos ao tratamento recebido pelo animal e expresso em percentual do total de tempo de exploração computado em segundos (Rossato *et al.*, 2007).



Figuras 3.5: Campo aberto utilizado para a realização do teste de memória de reconhecimento de objetos com esquema ilustrativo da utilização dos mesmos: A) Fase de teste; B) Memória de curta duração; C) Memória de longa duração.

Análise estatística

Os resultados experimentais estão expressos como médias $\pm$ desvio padrão para cada grupo. Para avaliar as diferenças entre as médias do peso e comprimento ao nascimento foi utilizado o teste t de Student e para verificar a evolução ponderal foi utilizado o teste t de Student pareado. Nas comparações entre os diferentes grupos de análise molecular e ansiedade foi utilizado o *two-way* ANOVA e para o comportamental, o *three-way* ANOVA com diferença significativa estabelecida em $p < 0,05$ e teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas.

3.2 Artigo Original

Os resultados desta etapa experimental estão apresentados a seguir no trabalho intitulado: **Efeitos do ambiente enriquecido sobre a plasticidade sináptica no hipocampo de ratos adultos submetidos à desnutrição precocemente**, que será submetido à publicação pela revista Learning and Memory.

Efeitos do ambiente enriquecido sobre a plasticidade sináptica no hipocampo de ratos adultos submetidos à desnutrição perinatal

¹ Waleska Maria Almeida Barros; ² Matheus Cavalcanti Pinho, ³ Tércya Lúcidí de Araújo Silva, ⁴ Eloyza Karoline Rozendo dos Santos, ⁵ Jefferson Diego Costa Vasconcelos, ⁶ Marília Freire Isidro, ⁷ Caroline Emiliane de Melo Tavares da Rosa e Silva, ⁸ Marco Antonio Fidalgo Amorim, ⁹ Rhowena Jane Barbosa de Matos

¹ Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão/PE; ² Departamento de Fisioterapia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFPE, Recife/PE; ³ Departamento de Anatomia, UFPE, Recife/PE; ⁴ Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas (CCB), UFPE, Recife/PE; ⁵ Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte, Centro Acadêmico de Vitória (CAV) - UFPE, Vitória de Santo Antão/PE; ⁶ Pós-graduação em Nutrição – UFPE, Recife/PE.

Running title: long term undernutrition and environment enrichment

Key words: environment enrichment, undernutrition, BDNF, hippocampus, rat

Correspondance: Dra. Rhowena Jane Barbosa de Matos

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Centro Acadêmico de Vitória

Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte

CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão, Brasil

TEL.: (81) 3523- 3351

(81) 8537- 2239

E-mail: rhowenajane@gmail.com

Total number of words in the manuscript: 8.806

RESUMO

O sistema nervoso (SN) possui habilidade para modificar sua organização morfofuncional em resposta a mudanças internas ou demandas externas, caracterizando-se assim a plasticidade cerebral. Fatores externos como a desnutrição durante as fases iniciais da vida podem alterar o desenvolvimento adequado do organismo e ocasionar na fase adulta danos nas funções do sistema nervoso. Entretanto, um outro fator ambiental, o ambiente enriquecido (AE), pode favorecer a memória através de alterações na expressão de fatores tróficos, especialmente o fator derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo. O presente estudo objetivou avaliar o efeito do ambiente enriquecido sobre a plasticidade sináptica no hipocampo de ratos adultos que foram submetidos à desnutrição no período perinatal. Foram utilizados ratos machos *Wistar* divididos em grupos segundo a dieta durante a gestação e lactação: controle (C) e desnutrido (D). Após o desmame, os filhotes receberam dieta Presence[®] e foram subdivididos segundo a exposição ao AE de 30 até 90 dias de vida: controle com AE (CAE); ou sem AE (CSAE); desnutrido com AE (DAE) ou sem AE (DSAE). A evolução ponderal foi modificada pela desnutrição e o peso ao nascer até os 70 dias de vida, após a exposição ao AE, foi menor que o controle; aos 80 dias, o grupo CAE apresentou menor peso, igualando-se ao DAE. Quanto aos aspectos de memória de reconhecimento de objetos, comparando intragrupo, tanto o CSAE quanto o DAE apresentaram memória de curta duração. A comparação entre grupos mostrou que a dieta e o ambiente enriquecido influenciaram na memória de longa duração, pois apenas o DAE aumentou o tempo de exploração do objeto novo. A dieta não modificou o comportamento dos grupos com relação à ansiedade. No entanto, após a exposição ao AE, o grupo CAE apresentou menor ansiedade e o DAE mostrou aumento no conflito de decisão de escolha. Quanto à expressão gênica do *bdnf*, a dieta provocou menor expressão no grupo DSAE e maior expressão após exposição ao AE nos grupos controle e desnutrido. Já quanto ao receptor *TrkB*, houve uma tendência à menor expressão no grupo DSAE e uma maior expressão no CAE e DAE. Esses resultados indicam que a dieta hipoproteica induziu baixo peso ao nascer e que essa modificação foi prolongada ao longo da vida, porém o AE não reverteu esse perfil, mostrando que há o efeito da plasticidade fenotípica sobre esse aspecto. Além disso, a dieta e o AE modificaram, à longo prazo, tanto o perfil gênico do *bdnf* quanto do seu receptor, bem como o comportamento de memória, demonstrando que o AE estimulou eventos plásticos no hipocampo dos indivíduos desnutridos, modificando assim a memória de longa duração.

ABSTRACT

The nervous system has the ability of modifying its morphofunctional organization in response to internal changes or external demands, featuring thus the brain plasticity. External factors such as the malnutrition during the early phases of life can alter the proper development of the organism, and cause in adulthood damages at the nervous system (NS) functions. However, another environmental factor, the enriched environment (EE), can enhance memory through changes at the expression of trophic factors, specially the brain derived neurotrophic factor (BDNF) at the adult animal brain. This study aimed to evaluate the effect of the enriched environment over the synaptic plasticity at the hippocampus in adult rats submitted to malnutrition during perinatal period of life. Male Wistar rats were used, divided in groups according to the diet during the gestation and lactation: control (C) and undernourished (D). After weaning, the littermates received Presence® diet and were subdivided according to the exposure to the EE from 30 to 90 days of age: Control with EE (CAE); or control without EE (CSAE); undernourished with EE (DAE) or without EE (DSAE). The weight gain was modified by the malnutrition and there was a decrease from the weight at birth until 70 days of age and after the exposure to EE; at 80 days of age, the DAE group recovered the weight. Regarding the object recognition memory aspects, both CAE and DAE groups exhibited more efficacy at short term memory, reducing the exploration time when compared with the without EE, however, only the DAE group demonstrated long term memory. The diet factor did not modify the group's behavior related to anxiety. However, exposure to EE, the group DAE reduced anxiety showed an increase in the conflict decision of choice. Regarding the gene expression of BDNF, the diet reduced DSAE group and increased after exposure to AE in the control and malnourished. As for the TrkB receptor, there was a tendency to decrease in the group DSAE, an increase in CAE and DAE. These results indicate that the low-protein diet induced low birth weight and that this modification was prolonged throughout life, but EA has not reversed this profile, showing that there is the effect of phenotypic plasticity on this aspect. In addition, modified diet and long-term AE, both the BDNF gene profile and its receptor, and the memory behavior, showing that the AE events stimulated hippocampus of plastics in malnourished individuals, thus altering their long-term memory.

Introdução

O período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) em mamíferos corresponde aos períodos pré e pós-natal precoce. Durante essa fase ocorrem alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas no SNC em que os períodos de crescimento, proliferação, diferenciação, migração e maturação celular não acontecem de forma linear (Morgane, Mokler e Galler, 2002). Existem fatores genéticos e não genéticos que interferem na ordenada maturação do SNC e essas alterações podem afetar capacidades cognitivas dos indivíduos (Morgane, Mokler e Galler, 2002; Silveira *et al.*, 2007). Entre os fatores exógenos destacam-se a nutrição (Laus *et al.*, 2011) e estimulação por ambiente enriquecido (AE) (Fernandez *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2006; Madronal *et al.*, 2010), os quais influenciam nos eventos de desenvolvimento do SNC (Katz, Davies e Dobbing, 1982; Morgane, Mokler e Galler, 2002). A desnutrição é um problema grave em países subdesenvolvidos (Barros *et al.*, 2006; Zhang, Li e Yang, 2010) e como tal, apresenta interesse contínuo, visto que há evidências de que os efeitos do insulto nutricional sobre o cérebro em desenvolvimento são de longa duração e ocasionam déficits permanentes na aprendizagem e comportamento (Morgane, Mokler e Galler, 2002).

A desnutrição nos períodos críticos do desenvolvimento pode levar a alterações na quantidade da liberação de neurotransmissores e diminuição na neuroplasticidade, além de uma redução no tamanho do cérebro (Morgane, Mokler e Galler, 2002; Laus *et al.*, 2011). Desse modo, embora muitas áreas do cérebro sejam afetadas pela restrição perinatal de nutrientes, a formação hipocampal é uma estrutura vulnerável (Zhang, Li e Yang, 2010), a qual tem como uma de suas funções, promover os processos de memória e aprendizagem, tipos de plasticidade sináptica (Neves, Cooke e Bliss, 2008). Estudos experimentais em roedores mostram que a restrição materna de dieta proteica ou alimento resultam em déficits morfofuncionais no hipocampo dos filhotes, levando à diminuição de neurônios, sinapses e arborização dendrítica (Bedi, 1991; Diaz-Cintra *et al.*, 1994), os quais podem interferir nos processos de memória a longo prazo.

A memória é um processo temporalmente graduado durante o qual novas informações podem ser consolidadas e armazenadas (Dudai, 2004) e apresenta algumas fases, incluindo a aquisição, consolidação, recuperação e a extinção (Kandel, 2001; Vianna *et al.*, 2001). Além disso, os tipos de memória quanto ao tempo de retenção das informações dividem-se em pelo menos duas: memória de curta duração (MCD), que dura de minutos a 1-3 horas e a memória de longa duração (MLD), a qual dura horas, dias ou anos e requer transcrição gênica e síntese proteica (Kandel, 2001; Kelleher *et al.*, 2004).

Essa plasticidade sináptica que ocorre no hipocampo pode estar relacionada a uma mudança na circuitaria em resposta a estímulos ambientais (Odelberg, 2005). Na circuitaria, a facilitação do processamento de informações pode ocorrer pelo mecanismo de potenciação a longo prazo (LTP), permitindo que haja mais conexões entre neurônios hipocampais a partir de 24 horas (Izquierdo e Medina, 1997). Para que ocorra a indução da LTP, a qual apresenta duas fases principais, é necessária a ativação do receptor N- metil D- aspartato (NMDA) pelo glutamato (Aroniadou e Teyler, 1991): LTP precoce e tardia, que se correlacionam com a memória a curto e longo prazo, respectivamente (Riedel, Platt e Micheau, 2003). Outros fatores que viabilizam esse mecanismo são os fatores neurotróficos, tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), um pequeno dímero de proteína expresso no cérebro de mamíferos adultos (Murer, Yan e Raisman-Vozari, 2001; Poo, 2001). Pesquisas demonstraram que o BDNF no hipocampo não está envolvido apenas com a consolidação da memória (Alonso, Vianna, Depino, *et al.*, 2002), mas também com a atividade neuronal dependente da reorganização sináptica, o que pode ser a base para a formação da memória (Alonso, Medina e Pozzo-Miller, 2004). Além do mais, resultados anteriores sugerem que o BDNF atua na formação da memória de longa duração (MLD) na região CA1 do hipocampo através da ativação do fator de transcrição gênica CREB (Alonso, Vianna, Izquierdo, *et al.*, 2002). Desse modo, as distorções na maturação coordenada de diferentes componentes do cérebro, bem como a diminuição da plasticidade sináptica e dos níveis de fatores neurotróficos, como o BDNF (Coupe *et al.*, 2009), vão interferir no crescimento ordenado e elaboração de circuitos neuronais, inclusive comprometendo a lógica e circuitos de memória e afetando os processos cognitivos (Morgane, Mokler e Galler, 2002).

Em contrapartida, a estimulação por ambiente enriquecido (AE) favorece alterações na plasticidade sináptica e neuronal na formação hipocampal (Tanti *et al.*, 2012), em particular um aumento na regulação dos níveis da proteína BDNF (Jurgens e Johnson, 2012; Kondo, Takei e Hirokawa, 2012). É provável também que um aumento no nível de BDNF induzido pelo exercício ocorra pela expressão aumentada do receptor TrkB no hipocampo (Li *et al.*, 2008), em que o nível de ativação deste receptor está correlacionado à disponibilidade do BDNF (He *et al.*, 2004). O termo enriquecimento ambiental consiste na utilização de um ambiente complexo que geralmente envolve a utilização de brinquedos, túneis, pontes e rodas de corrida. Os animais são alojados em maior número e em gaiolas frequentemente maiores para facilitar a interação social. Os objetos utilizados em tal ambiente aumentam a estimulação sensorial, assim como a busca pela novidade, uma vez que os mesmos são substituídos ou movidos de lugar com frequência determinada (Birch,

Mcgarry e Kelly, 2013), podendo favorecer a retenção de novas informações. Como o enriquecimento ambiental também pode incluir aumento da estimulação social através do agrupamento, pode haver em contrapartida a indução do comportamento agressivo, visto que os roedores são animais exploratórios e quando desnutridos em períodos precoces da vida pode ocorrer disputa pela alimentação (Katz, Davies e Dobbing, 1982).

No entanto, as questões sobre se os mecanismos de memória de reconhecimento de objetos no adulto são alterados pela desnutrição precoce e ainda se o ambiente enriquecido apresenta função facilitadora da plasticidade sináptica no hipocampo dos animais desnutridos precocemente, não foram completamente explorados. No presente estudo, examinamos as consequências a longo prazo da desnutrição pré e pós-natal em roedores expostos ou não a um ambiente enriquecido sobre a memória de curta e longa duração e a expressão gênica do *bdnf* no hipocampo.

Materiais e métodos

Animais

Ratas *Wistar* pesando 200-250 g foram obtidas do Departamento de Nutrição da Universidade de Pernambuco (Brasil) e mantidas sob condições controladas (ciclo claro/escuro, 12/12 horas invertido e temperatura 22 ± 2 ° C, comida e água *ad libitum*). Os animais foram transportados para o Biotério do Departamento de Anatomia e adaptados ao ambiente por dez dias. No final deste período, as fêmeas primíparas foram acasaladas com os ratos na proporção de 2:1 e após a confirmação do acoplamento por meio da visualização de espermatozóides no esfregaço vaginal, as ratas gestantes foram alojadas individualmente para os experimentos seguintes. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do comitê de ética animal da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, sob o protocolo nº 23076.018667/2012/22.

Dieta materna e dos filhotes

As gestantes foram separadas nos seguintes grupos, de acordo com a dieta: grupo controle (17% de caseína) e grupo desnutrição proteica (8% de caseína) durante os períodos de gestação e lactação, água e comida *ad libitum*. O tamanho da ninhada foi ajustado para oito animais machos por genitora. Todos os filhotes foram amamentados até os 25 dias (Ost'adalova e Babicky, 2012). Após esse período, os filhotes foram separados das mães e mantidos quatro animais em cada caixa de prolipropileno, sendo alimentados com a dieta padrão do biotério (Presence ®) e água *ad libitum*. A exposição ao AE foi

realizada a partir dos 30 até os 90 dias de idade, em que os animais foram subdivididos em quatro grupos de acordo com o alimento fornecido durante as fases de gestação e lactação e exposição ao ambiente enriquecido (AE): controle sem ambiente enriquecido (CSAE), controle com ambiente enriquecido (CAE), desnutrido sem ambiente enriquecido (DSAE) e com ambiente enriquecido (DAE).

Ambiente enriquecido

Foram colocados oito animais por gaiola de AE, as quais continham as seguintes dimensões: 61 x 44 x 63 cm (largura x profundidade x altura). Os objetos utilizados foram tubos de plástico, túneis, escadas retas e circulares, bolas, bonecos e casas de plástico. Os brinquedos foram trocados e/ou rearranjados a cada cinco dias para nova estimulação, minimizando os efeitos da habituação (Beauquis *et al.*, 2010).

Mensuração do peso e comprimento dos animais

O peso dos animais foi mensurado do nascimento aos 90 dias de vida semanalmente, enquanto o comprimento naso-anal até os 70 dias. O peso corporal foi mensurado em balança eletrônica digital (Marte®, modelo S-1000, 1 kg de capacidade e sensibilidade de 0,1 g). Com os dados do peso (g) e comprimento (cm) foi calculado o Índice de Massa Corporal ($IMC = \text{Peso (g)} / \text{comprimento (cm)}^2$).

Análise da Expressão Gênica do BDNF e TRKb

PCR em tempo real

Aos 90 dias de vida, os animais foram decapitados às 7h da manhã, no início do ciclo escuro, em que começa o período de maior atividade dos roedores. Os crânios foram imediatamente dissecados e os encéfalos rapidamente congelados em gelo seco e armazenados num freezer -80°C. O experimento de PCR em tempo real foi realizado nas amostras de hipocampo seguindo as etapas descritas resumidamente a seguir. O RNA total foi extraído utilizando 1 ml do reagente Trizol (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) com um homogeneizador (Pellet Pestle with Cordless Motor, Fisher Scientific, EUA). O RNA total foi isolado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante Invitrogen e, subsequentemente, a

quantidade e qualidade do RNA purificado foi avaliado utilizando-se o espectrofotômetro, NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, as amostras de RNA foram tratadas com tampão de gDNA Wipeout (Qiagen[®], Hilden, Alemanha) para remover eficazmente a contaminação do DNA genômico durante 2 min a 42 ° C, e armazenados em gelo. Posteriormente, foi realizada a transcrição reversa de 2,0 µg de RNA purificado, utilizando o kit de transcrição reversa QuantiTect (Qiagen[®], Hilden, Alemanha), a 42°C durante 15 min. A enzima foi inativada a 95°C durante 3 minutos em um volume total de 20 µl de água livre de RNase. A preparação de cDNA foi, em seguida, armazenada a -20°C até a sua utilização. Posteriormente, 5 µl de cada amostra diluída de cDNA foi utilizada como *template* para a amplificação por PCR utilizando SYBR Green (Qiagen[®], Hilden, Alemanha), como fluoróforo intercalante. Utilizou-se o sistema de detecção de PCR em tempo real: Rotor Gene HRM-2Plex (Qiagen[®], Hilden, Alemanha). Os parâmetros do PCR foram: primeiro passo de desnaturação inicial de 5 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de 5s a 95°C, e 10 s a 60°C. Os iniciadores utilizados para a amplificação estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Sequências de *primers* desenhados para estudo de PCR em tempo real dos genes: *bdnf*, *trkb* e do gene constitutivo de referência *gapdh*.

Primer	Forward	Reverse
<i>bdnf</i>	5'-TCAGATCTCTTCTGTGTGCGTGAGT-3'	5'-GGAGATCTCTCTCTGTTCTTCAGCAA-3'
<i>trkb</i>	5'-GCCATCAGCACCAAGCAGCAAGAG-3'	5'-GAAGCCCAAGACCAGCAAGCATAAGC-3'
<i>gapdh</i>	5'-GCGAGATCCGTCGAAGATCA-3'	5'-CCACAGTCTTCTGAGTGGCAG-3'

Os valores limites de ciclo (do inglês, “*cycle threshold*”, CT) das amostras foram determinados pela normalização a partir das curvas de fluorescência *versus* o número de ciclos do PCR durante a amplificação exponencial. As curvas padrão para todas as amplificações dos *primers* (ou oligonucleotídeos) foram geradas, traçando os valores médios dos valores de CT em função do logaritmo da quantidade de moléculas *template* (molde) alvo. Todas as quantificações foram normalizadas para o gene de referência (ou *house-keeping*): *desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato* (GAPDH). O valor da quantificação relativa de cada gene alvo foi analisado utilizando um método CT comparativo. A seguinte fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi usada para calcular a quantidade relativa do transcrito na amostra e normalizado com o de referência endógena GAPDH: $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre a CT no gene de interesse e GAPDH, e $\Delta\Delta CT$ para a amostra é igual a média do ΔCT da amostra menos

a média do ΔCT da amostra de controle sem exposição ao ambiente (utilizada como calibração).

Análises comportamentais

Memória de reconhecimento de objetos

Quando os ratos são apresentados a objetos familiares e novos, há uma tendência a se dirigirem à exploração de novos objetos, visto que os roedores são animais exploratórios. Este comportamento típico é utilizado para conceber um paradigma comportamental conhecido como tarefa de reconhecimento de objetos, o qual tem sido amplamente utilizado para avaliar a memória de reconhecimento (Ennaceur e Delacour, 1988). A tarefa de reconhecimento de objeto foi realizada em uma arena de campo aberto (1 m de diâmetro), construída em EVA (etileno vinil acetato) preto com 1 cm de espessura e delimitado por 30 cm de altura. As superfícies da base do campo aberto também foram feitas de E.V.A. na cor preta e colocadas na parte inferior do dispositivo para facilitar a circulação do animal e proporcionar um maior contraste entre este e a superfície. Antes que o experimento fosse realizado, todos os animais foram habituados à arena experimental aos 85 dias de vida, permitindo-lhes explorar o campo aberto livremente 20 minutos por dia, durante 3 dias, na ausência de objetos. Todos os testes foram realizados à 7 horas da manhã, início do ciclo escuro e momento em que os animais estão em sua maior atividade. Os objetos de vidro, conhecido ou novo, bem como a posição relativa dos dois objetos de estímulo foram permutados aleatoriamente para cada animal experimental. No dia 1 (fase de teste), o animal foi colocado no campo aberto contendo dois objetos diferentes (A e B) e durante 5min, observou-se a livre exploração do ambiente. Para analisar a memória de curta duração, após 180 min. da fase de teste, o objeto B foi trocado por um objeto novo (C) e cada rato foi reintroduzido no campo aberto por um período de 5 min. A arena de campo aberto e os objetos de estímulo foram cuidadosamente limpos entre os ensaios para garantir a ausência de estímulos olfativos. Para a verificação da memória de longa duração, após 24h o objeto C foi trocado pelo objeto novo (D) e os animais reintroduzidos na arena. A exploração foi definida como cheirar ou tocar o objeto de estímulo com o nariz e/ou as patas dianteiras. Sentar ou girar em torno dos objetos não foi considerado comportamento exploratório. Uma câmera foi posicionada sobre a arena (a 1m) e o comportamento dos animais foi filmado para posterior análise. O tempo gasto explorando cada objeto foi avaliado por três observadores cegos ao tratamento e expresso como uma porcentagem do tempo total de exploração em segundos (Rossato *et al.*, 2007).

Labirinto em cruz elevado

Para avaliar o estado de ansiedade, os ratos foram expostos a um labirinto em cruz elevado, conforme descrito por Pellow *et al.*, 1985. O teste é baseado num procedimento utilizado por Montgomery, 1955 em que o aparelho consiste de dois braços abertos e dois fechados. Durante o teste, os ratos foram colocados no centro do labirinto, com a cabeça voltada para o braço fechado e número total de entradas nos quatro braços, o número de entradas e tempo gasto nos braços abertos e o tempo no centro foram registrados em uma sessão de 5 min aos 60 dias de vida. Todos os testes foram realizados às 12 horas da manhã.

O confinamento nos braços fechados está associado à observação de um aumento significativo no comportamento relacionado à ansiedade. Os registros foram realizados por aquisição das imagens por câmera com sistema infravermelho e armazenados em computador. Três avaliadores cegos ao tratamento observaram os filmes e registraram em protocolo o tempo de permanência e o número de entradas em cada braço. O registro de cada entrada teve validade a partir do momento em que o animal encontrou-se com as 4 patas (2 anteriores e 2 posteriores) em um dos braços do labirinto. O tempo de cada animal foi marcado através de um cronômetro digital. A proporção e a percentagem do total de entradas, o tempo de permanência nos braços abertos e o tempo gasto no centro, foram utilizados como índice de ansiedade.

Análise estatística

Os resultados experimentais estão expressos como médias $\pm$ desvio padrão para cada grupo. Para avaliar as diferenças entre as médias do peso e comprimento ao nascimento foi utilizado o teste t de Student e para verificar a evolução ponderal foi utilizado o teste t de Student pareado. Nas comparações entre os diferentes grupos de análise molecular e teste de ansiedade comportamental foi utilizado o *two-way* ANOVA e para o teste de memória de reconhecimento de objetos, o *three-way* ANOVA com diferença significativa estabelecida em $p < 0,05$ e teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas.

Resultados

Os efeitos da restrição proteica perinatal no peso corporal e índice de massa corporal

Peso corporal

Em geral, a desnutrição perinatal ocasiona modificações a longo prazo na evolução ponderal em animais e humanos. Nós investigamos se as diferentes concentrações proteicas da dieta (Caseína 8% e 17%) causaram modificações no peso dos animais do nascimento aos 90 dias de vida. Com relação à evolução ponderal neonatal, as análises das médias dos grupos revelaram que houve diferença a partir do 1° dia de vida, em que a desnutrição provocou um menor peso ao nascer que persistiu até o 30° dia de vida quando comparado ao controle, ver Figura 1 e Tabela 2.

Tabela 2. Médias do peso corporal dos grupos experimentais durante o período de lactação após desnutrição durante o período perinatal.

Dia	Controle (média em g $\pm$ DP, n)	Desnutrido (média em g $\pm$ DP, n)	p
1° dia	6,51 $\pm$ 0,37, n=24	5,83 $\pm$ 0,41, n=26	0,00
7° dia	17,14 $\pm$ 1,37, n=26	12,22 $\pm$ 1,94, n=25	0,00
14° dia	31,89 $\pm$ 2,34, n=23	22,04 $\pm$ 1,53, n=25	0,00
21° dia	51,41 $\pm$ 4,35, n=24	34,07 $\pm$ 3,14, n=27	0,00
30° dia	97,20 $\pm$ 7,01, n=26	70,63 $\pm$ 5,79, n=26	0,00

Teste t de Student no 1° dia. A partir do 7°: Teste T de Student pareado, seguido de comparações múltiplas, *post-hoc* Tukey .

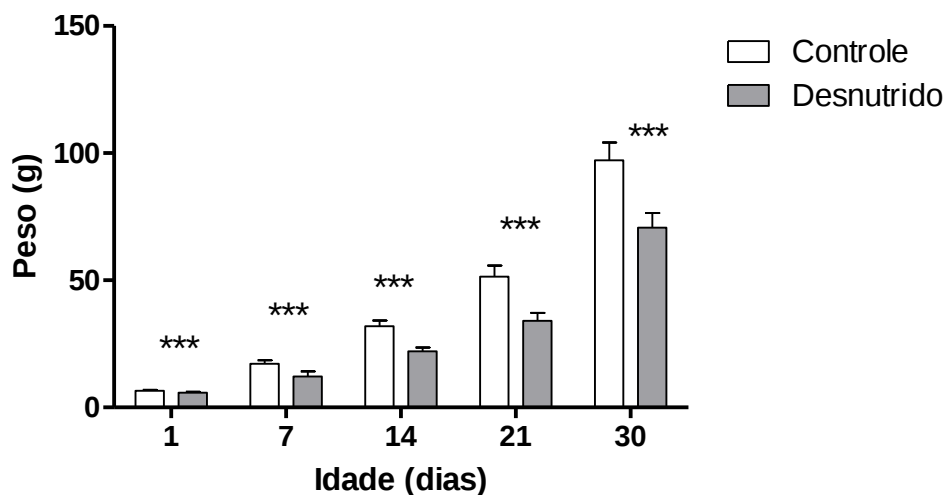


Figura 1. Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do peso neonatal de ratos. Os grupos controle e desnutrido foram alimentados, respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8%

de proteína até o desmame. *** $p < 0.001$, teste t de Student no 1º dia. A partir do 7º dia Teste T de Student pareado, seguido de comparações múltiplas, teste *post-hoc* Tukey.

Com relação à evolução ponderal dos 40 aos 90 dias de vida, o grupo DAE acompanhou o peso do grupo CAE a partir dos 70 dias, com persistência desse padrão até os 90 dias, ver Tabela 3 e Figura 2.

Tabela 3. Médias do peso corporal dos grupos Controle e Desnutrido após a exposição ao ambiente enriquecido.

Dia	CSAE (média em g $\pm$ DP)	DSAE (média em g $\pm$ DP),p	CAE (média em g $\pm$ DP)	DAE (média em g $\pm$ DP),p
40º dia	157,87 $\pm$ 14,72	119,66 $\pm$ 7,58, a	152,83 $\pm$ 11,33	117,16 $\pm$ 7,48, b
50º dia	227,18 $\pm$ 16,94	187,87 $\pm$ 18,75, a	202,05 $\pm$ 20,35	168,87 $\pm$ 8,60, b
60º dia	279,49 $\pm$ 23,24	228,54 $\pm$ 19,51, a	259,81 $\pm$ 24,92	223,05 $\pm$ 12,30,b
70º dia	304,46 $\pm$ 28,01	276,90 $\pm$ 19,56, a	282,58 $\pm$ 32,06	267,95 $\pm$ 21,86
80º dia	267,95 $\pm$ 21,86	294,31 $\pm$ 20,01, a	288,79 $\pm$ 26,82	288,60 $\pm$ 15,96
90º dia	340,05 $\pm$ 29,30	298,30 $\pm$ 16,88, a	306,03 $\pm$ 34,70	306,03 $\pm$ 34,70

Two-way ANOVA, seguido de comparações múltiplas, teste *post-hoc* Tukey. a= diferença entre os grupos CSAE e DSAE; b= diferença entre os grupos CAE e DAE.

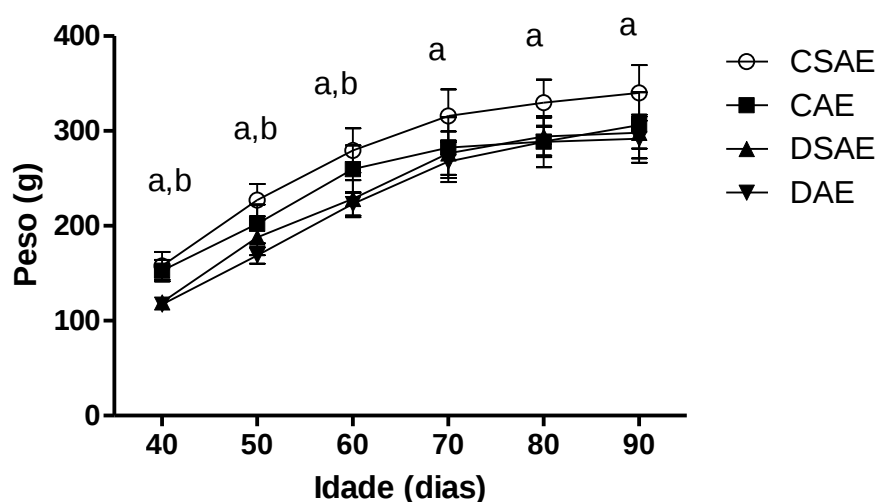


Figura 2. Evolução ponderal. Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do peso corporal de ratos a partir de 40 dias, após a exposição ao ambiente enriquecido. Os grupos controle e desnutrido foram alimentados respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8% de proteína até o desmame, após esse período receberam dieta padrão. Os dados estão expressos em média do peso

em gramas $\pm$ DP. $n=64$, a= diferença entre grupos Csae e Dsae e b= diferença entre grupos Cae e Dae, $p < 0,001$. Teste Two-way ANOVA, *post-hoc* Tukey.

Avaliação do índice de massa corporal (IMC)

No período neonatal, os dados do IMC demonstraram diferença entre os grupos controle e desnutrido a partir do 1° dia de vida até o 30° dia, em que houve menor evolução do IMC do grupo desnutrido, quando comparado ao controle, ver Tabela 4 e Figura 3.

Tabela 4. Médias do IMC dos grupos experimentais durante o período de lactação após desnutrição durante o período perinatal.

Dia	Controle (média em g $\pm$ DP, n)	Desnutrido (média em g $\pm$ DP, n)	p
1° dia	0,25 $\pm$ 0,03, n=28	0,23 $\pm$ 0,02, n=28	0,00
7° dia	0,32 $\pm$ 0,03, n=28	0,28 $\pm$ 0,03, n=31	0,00
14° dia	0,35 $\pm$ 0,02, n=27	0,31 $\pm$ 0,03, n=31	0,00
21° dia	0,37 $\pm$ 0,02, n=28	0,31 $\pm$ 0,02, n=31	0,00
30° dia	0,46 $\pm$ 0,03, n=30	0,40 $\pm$ 0,02, n=30	0,00

Teste t de Student no 1° dia. A partir do 7°: Teste T de Student pareado, seguido de comparações múltiplas, *post-hoc* Tukey.

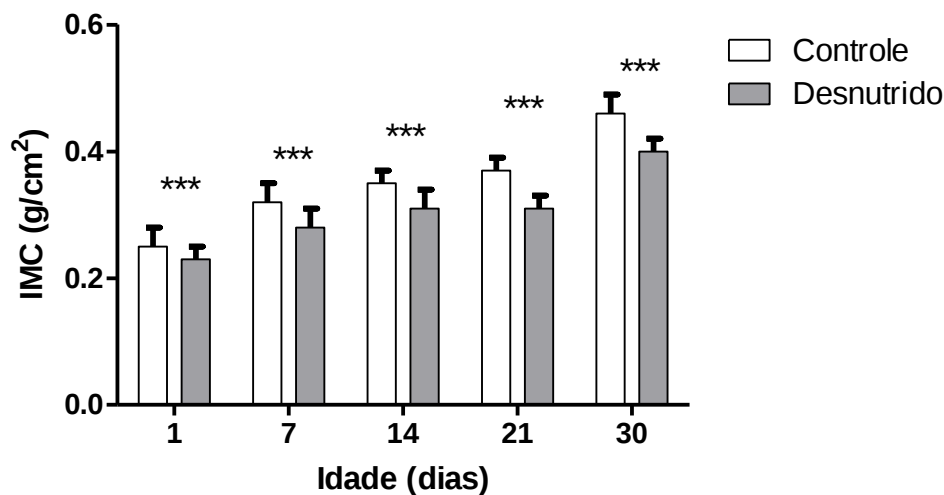


Figura 3. Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do Índice de Massa Corporal (IMC) neonatal de ratos. Os grupos controle e desnutrido foram alimentados, respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8% de proteína até o desmame. *** $p < 0,001$, teste t de Student no 1° dia. A partir do 7° dia, Teste T de Student pareado, seguido de comparações múltiplas, teste *post-hoc* Tukey.

Após o desmame a diferença observada não continuou até os 90 dias entre os grupos controle e desnutrido, ver Tabela 5 e Figura 4.

Tabela 5: Médias do IMC dos grupos Controle e Desnutrido após a exposição ao ambiente enriquecido.

Dia	CSAE (média em g $\pm$ DP)	DSAE (média em g $\pm$ DP)	CAE (média em g $\pm$ DP)	DAE (média em g $\pm$ DP)
40° dia	0,53 $\pm$ 0,07, n=13	0,50 $\pm$ 0,05, n=15	0,52 $\pm$ 0,03, n=13	0,49 $\pm$ 0,02, n=15
50° dia	0,58 $\pm$ 0,04, n=14	0,59 $\pm$ 0,07, n=14	0,57 $\pm$ 0,04, n=14	0,57 $\pm$ 0,08, n=14
60° dia	0,62 $\pm$ 0,04, n=14	0,58 $\pm$ 0,06, n=14	0,59 $\pm$ 0,03, n=14	0,59 $\pm$ 0,06, n=14
70° dia	0,61 $\pm$ 0,04, n=14	0,63 $\pm$ 0,04, n=14	0,63 $\pm$ 0,05, n=15	0,63 $\pm$ 0,05, n=14

Two-way ANOVA, seguido de comparações múltiplas, teste *post-hoc* Tukey. $p>0,05$ (diferença entre os grupos CSAE e DSAE e entre os grupos CAE e DAE).

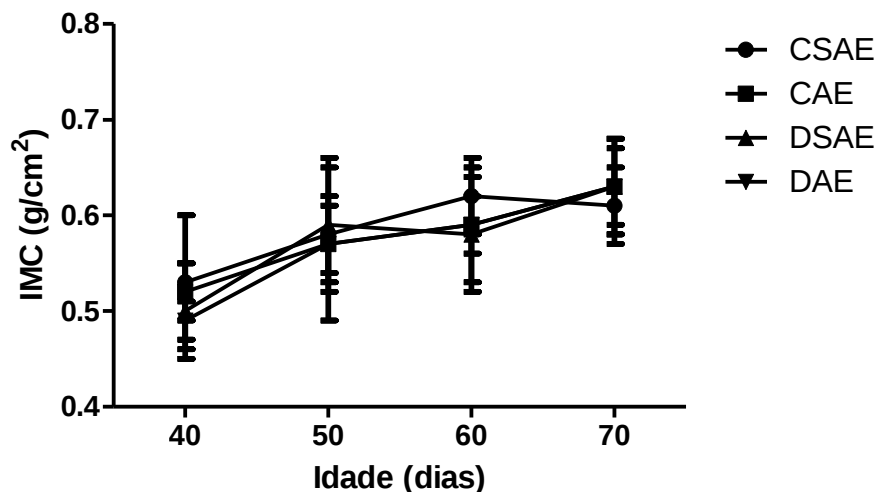


Figura 4. Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do índice de massa corporal (IMC) de ratos a partir de 40 dias, após a exposição ao ambiente enriquecido. Os grupos controle e desnutrido foram alimentados respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8% de proteína até o desmame, após esse período receberam dieta padrão. Os dados estão expressos em média do peso em gramas $\pm$ DP. n=64. Teste Two-way ANOVA, *post-hoc* Tukey.

Labirinto em cruz elevado

Através do teste do labirinto em cruz elevado identificamos a presença de ansiedade dos ratos quantificando o tempo em que o animal permaneceu no braço aberto, no braço

fechado ou na região central do labirinto. Quanto ao tempo de permanência no braço aberto, os resultados mostraram que o fator desnutrição quando avaliado isoladamente não provocou ansiedade, visto que não houve diferença entre as médias de tempo de permanência no braço aberto entre os grupos CSAE e DSAE (CSAE= $105,07 \pm 4,34s$, $n=10$; DSAE= $116,09 \pm 13,76s$, $n=12$, $p>0,05$). Entretanto, verificou-se que houve efeito do AE no grupo controle, visto que o grupo CAE permaneceu por mais tempo no braço aberto (CSAE= $105,07 \pm 4,34s$, $n=10$; CAE= $122,64 \pm 14,24s$, $n=10$, $p<0,05$), o que denota menor ansiedade; porém, a exposição ao AE não a ansiedade no grupo desnutrido (DSAE= $116,09 \pm 13,76s$, $n=12$; DAE= $123,73 \pm 14,82s$, $n=12$, $p>0,05$). ver Figura 5.

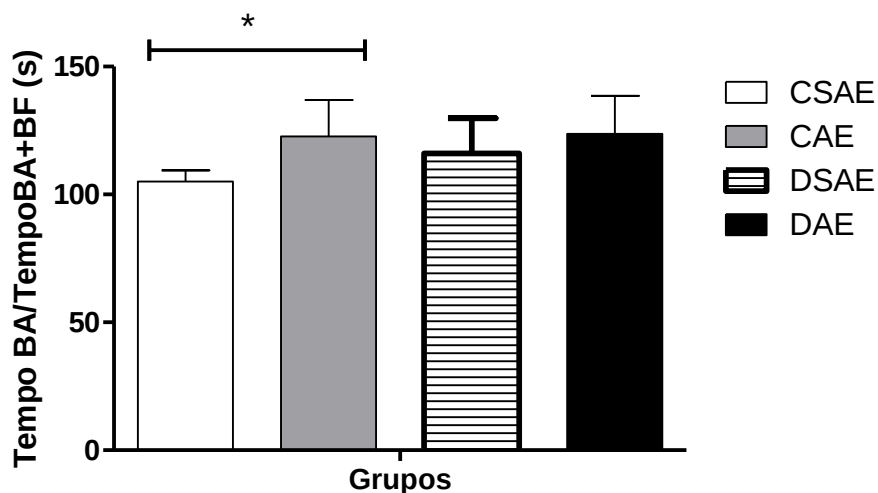


Figura 5. Efeito a longo prazo da desnutrição sobre o tempo de exploração do braço aberto no teste de ansiedade em animais jovem-adultos após exposição ao ambiente enriquecido. Aos 60 dias foi avaliada a ansiedade no labirinto de cruz elevado nos grupos: controle sem ambiente (CSAE), controle com ambiente (CAE), desnutrido sem ambiente (DSAE) e com ambiente (DAE). O teste foi realizado em cinco minutos contabilizando o tempo no braço aberto/tempo braço aberto + braço fechado (s). Os valores estão representados em média $\pm$ DP. Teste two-way ANOVA, teste *post-hoc* Tukey. $n=64$, $*p<0,05$

Os dados do tempo de permanência no centro mostraram que há efeito da dieta sobre esse tempo entre os grupos CSAE e DSAE. Houve uma diminuição do tempo de permanência ($p<0,05$) no centro pelo desnutrido sem AE ($73,42 \pm 6,13s$, $n=15$) comparado ao CSAE ($77,68 \pm 10,59s$, $n=10$). Entretanto, quanto à exposição ao ambiente enriquecido o efeito foi diferente, pois o DAE ($84,73 \pm 17,29s$, $n=15$) aumentou seu tempo no centro quando comparado ao grupo CAE ($60,33 \pm 6,71s$, $n=10$), houve diferença significativa ($p<0,05$). Os animais do grupo DAE permaneceram por mais tempo no centro do labirinto em cruz

elevado. Os comportamentos exibidos na plataforma central do labirinto, geralmente estão relacionados ao conflito/avaliação de risco, os quais foram alterados pela dieta e após exposição ao AE, Figura 6.

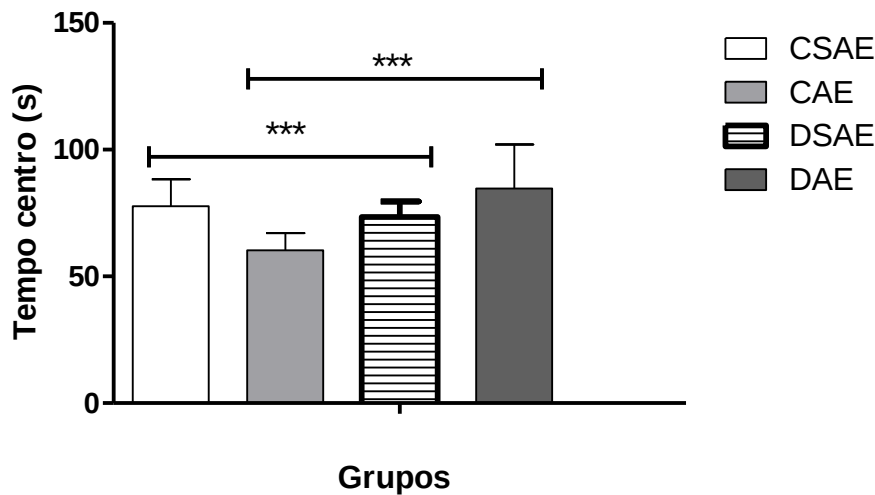


Figura 6 : Efeito a longo prazo da desnutrição sobre o tempo de permanência no centro do labirinto em cruz elevado no teste de ansiedade em animais jovem-adultos após exposição ao ambiente enriquecido. Aos 60 dias foi avaliada a ansiedade no labirinto de cruz elevado nos grupos: controle sem ambiente (CSAE), controle com ambiente (CAE), desnutrido sem ambiente (DSAE) e com ambiente (DAE). O teste foi realizado em cinco minutos contabilizando o tempo no centro do labirinto em cruz elevado. Os valores estão representados em média $\pm$ DP. Teste two-way ANOVA, teste *post-hoc* Tukey. $n=64$, *** $p<0.0001$.

Em relação à frequência de entrada no braço aberto, houve efeito da dieta, devido ao DSAE ($10,60 \pm 0,52s$, $n=13$) apresentar uma frequência menor quando comparado ao CSAE ($CSAE= 11,40 \pm 0,53$, $n=10$). Após exposição ao AE, o grupo DAE continuou com a menor frequência de entrada no braço aberto ($DAE= 11,77 \pm 0,52s$, $n=15$), quando comparado ao CAE ($12,83 \pm 0,54s$, $n=10$), $p<0,001$. Os dados mostram que a exposição ao AE não modificou o estado de ansiedade, pois o estado da resposta, quanto a uma frequência de entrada no braço aberto, permaneceu inalterado quando houve mudança de ambiente, Figura 7.

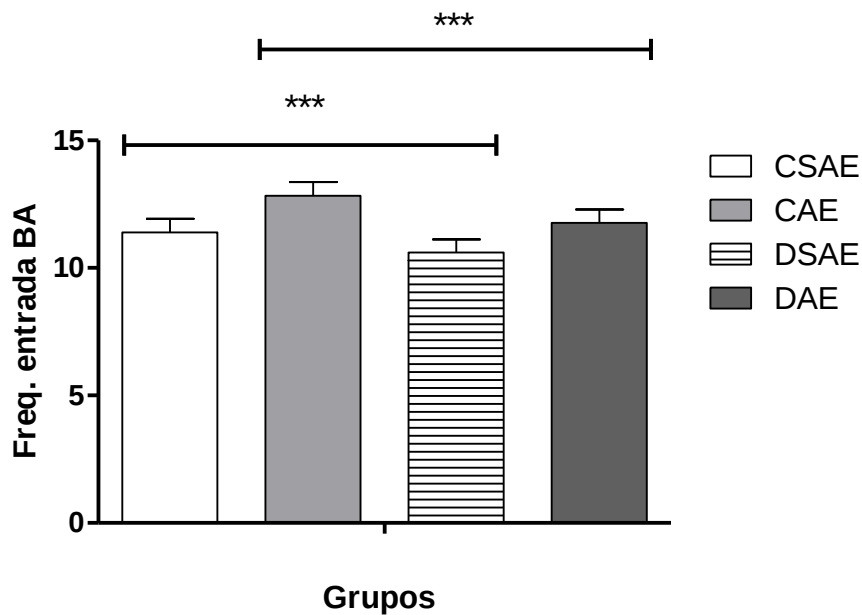


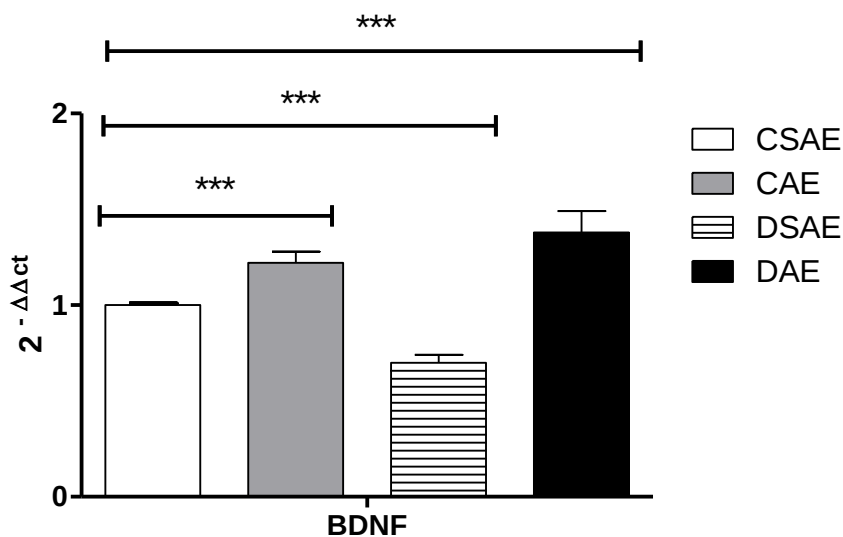
Figura 7 : Efeito a longo prazo da desnutrição sobre a Frequência de entrada no braço aberto do labirinto em cruz elevado no teste de ansiedade em animais jovem-adultos após exposição ao ambiente enriquecido. Aos 60 dias foi avaliada a ansiedade no labirinto de cruz elevado nos grupos: controle sem ambiente (CSAE), controle com ambiente (CAE), desnutrido sem ambiente (DSAE) e com ambiente (DAE). O teste foi realizado em cinco minutos contabilizando a Frequência de entrada no braço aberto do labirinto em cruz elevado. Os valores estão representados em média $\pm$ DP. Teste two-way ANOVA, teste *post-hoc* Tukey. $n=64$, $***p<0.0001$.

Expressão gênica do *bdnf* e do receptor *TrkB*

Ao utilizar o método de quantificação PCR em tempo real, verificou-se que a expressão gênica do *bdnf* no hipocampo foi modificada tanto pela desnutrição quanto pela exposição ao AE. Os dados mostram que a desnutrição modificou os níveis de expressão do *bdnf* no grupo DSAE, em que a expressão deste foi menor em 23% quando comparado ao controle sem AE (CSAE= $1,00 \pm 0,01$, $n=5$; DSAE= $0,79 \pm 0,04$, $n=5$, $p=0,001$). Entretanto, o efeito observado após exposição ao AE no grupo controle foi oposto, pois houve uma maior expressão gênica no grupo CAE de 22%, quando comparado ao controle (CSAE= $1,00 \pm 0,01$, $n=5$; CAE= $1,22 \pm 0,06$, $n=5$; $p=0,001$). Porém, o ambiente enriquecido modificou em cerca de 75% a expressão gênica do *bdnf* no grupo DAE, em que houve uma maior expressão gênica deste quando comparado ao controle (CSAE= $1,00 \pm 0,01$, $n=5$, DAE= $1,38 \pm 0,11$, $n=5$, $p=0,000$). Todos os sacrifícios foram realizados 1 dia após o término

da realização do teste de memória de reconhecimento de objetos e uma breve estimulação ao campo aberto por 1 min, indicando que uma maior expressão do RNAm do *bdnf* está associada à aquisição da memória de tais animais, Figura 8A. Quanto à expressão do receptor *TrkB*, os resultados mostram que houve efeito do ambiente enriquecido em tal resultado, visto que o grupo CAE apresentou uma maior expressão do *TrkB* em 120%, quando comparado ao controle (CSAE= $0,99 \pm 0,06$, n=5; CAE= $2,17 \pm 0,10$, n=5, p=0,000). Para o grupo desnutrido a resposta foi semelhante, houve uma maior expressão gênica do receptor *TrkB* de 174%, quando comparado ao controle (CSAE= $1,00 \pm 0,01$, n=5; DAE= $2,22 \pm 0,19$, n=5, p=0,000). Porém, apenas o efeito dieta mostrou-se com uma tendência à diminuição na expressão do *TrkB* no grupo DSAE (CSAE= $0,99 \pm 0,06$, n=5; DSAE= $0,80 \pm 0,04$, n=5, p=0,09), Figura 8B.

A)



B)

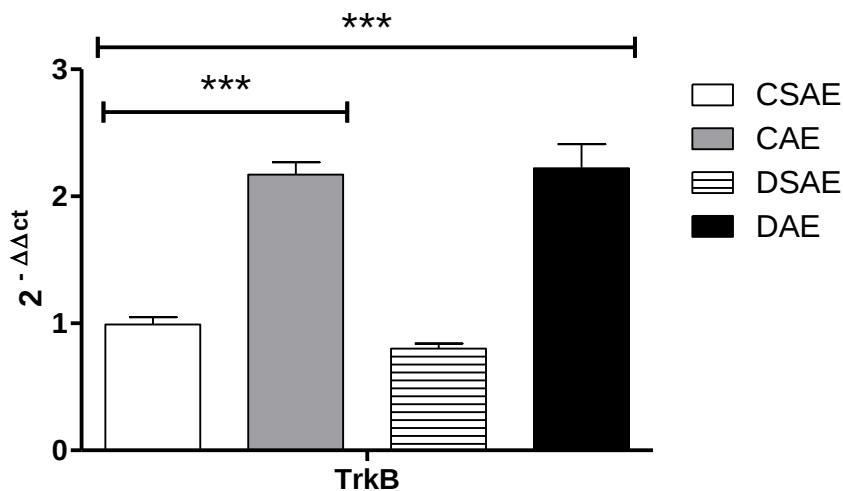


Figura 8. Efeitos a longo prazo da desnutrição perinatal após a exposição crônica ao ambiente enriquecido em ratos adultos sobre a expressão gênica do *bdnf* (A) e *trkb* (B). As análises relativas do PCR em tempo real da expressão gênica nos hipocampus foram realizadas pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os valores estão representados em média $\pm$ DP de 5 amostras diferentes de RNAm. Foi utilizado two-way ANOVA, *** $p < 0,001$. *post-hoc* Tukey.

Memória de reconhecimento de objetos

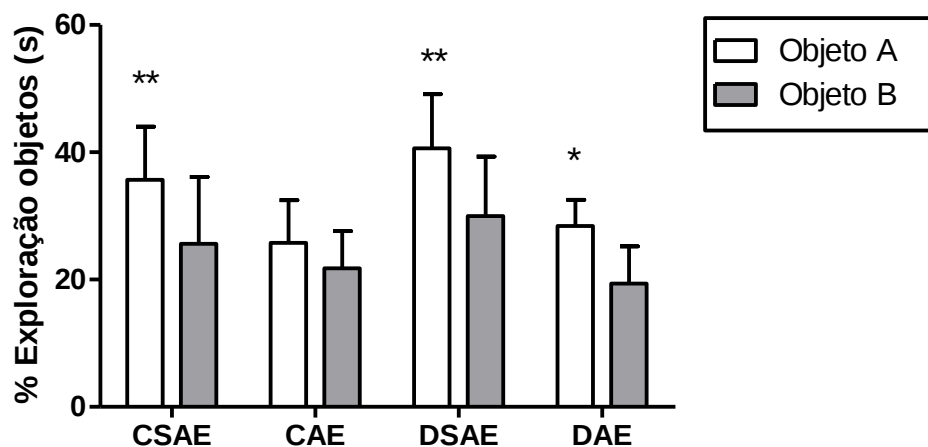
Para a análise de reconhecimento de objetos as etapas avaliadas durante o primeiro momento, chamado de teste, mostrou que os animais CSAE, DSAE E DAE exploraram preferencialmente os objetos “A” quando comparados intragrupo, entretanto, entre grupos não houve diferença, em que a exploração dos objetos foi aleatória, sem apresentar nenhuma preferência (Fase teste: CSAE= $73,30 \pm 26,71$, $n=10$; DSAE= $74,07 \pm 21,70$, $n=10$, $p=1,00$; CAE= $90,78 \pm 11,02$, $n=10$; DAE= $66,83 \pm 13,82$, $n=10$, $p=0,97$).

Ao avaliar a memória de curta duração intragrupo houve memória de curta duração nos grupos CSAE e DAE. Ao avaliar o teste de memória de curta duração entre grupos os ratos submetidos à desnutrição sem AE não apresentaram diferença no percentual de exploração do objeto novo, quando comparados ao controle sem AE (CSAE= $171,92 \pm 73,65$, $n=10$; DSAE= $125,62 \pm 19,37$, $n=10$, $p=0,34$), indicando que o efeito da dieta não modificou, por si só, a memória de curta duração. O mesmo aconteceu com os ratos que foram desnutridos e expostos ao AE durante o teste de memória de curta duração, quando comparados ao controle com AE (CAE= $142,84 \pm 30,27s$, $n=10$; DAE= $176,36 \pm 25,40s$, $n=10$, $p=0,80$). Quando apenas o fator ambiente é levado em consideração, não houve interação na exploração de objetos, em que os animais expostos ao ambiente não apresentaram

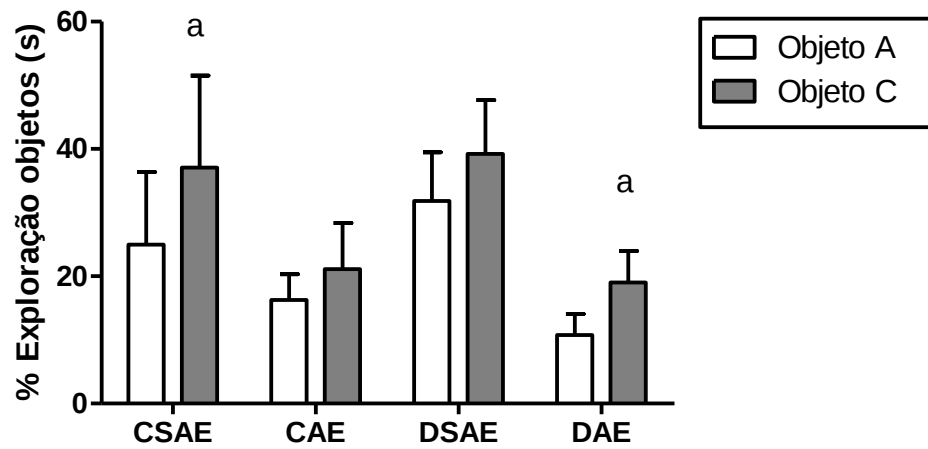
memória de curta duração (CSAE= $171,92 \pm 73,65s$, $n=10$; CAE= $142,84 \pm 30,27s$, $n=10$, $p=0,91$).

Os grupos CSAE, CAE e DSAE, quando considerados isoladamente, não apresentaram a memória de longa duração, enquanto no grupo DAE houve tal tipo de memória (CSAE= $98,74 \pm 23,57s$, $n=10$, $p=0,98$; CAE= $124,65 \pm 39,34s$, $n=10$, $p=0,20$; DSAE= $129,32 \pm 40,69s$, $n=10$, $p=0,11$; DAE= $203,72 \pm 88,40$, $n=10$, $p=0,00$). Quanto ao fator dieta, não houve diferença entre o tempo de exploração do objeto novo nos animais dos grupos CSAE e DSAE (CSAE= $98,74 \pm 23,57s$, $n=10$; DSAE= $129,32 \pm 40,69s$, $n=10$, $p=0,88$). Entretanto, os animais do grupo desnutrido expostos ao AE apresentaram memória de longa duração quando comparados entre grupos ao controle com AE, demonstrando que houve interação entre a dieta, o ambiente enriquecido e a exploração de objetos nesse grupo (CAE= $124,65 \pm 39,34s$, $n=10$; DAE= $203,72 \pm 88,40$, $n=10$, $p=0,0023$). Ver figuras 9A, 9B e 9C.

A)



B)



C)

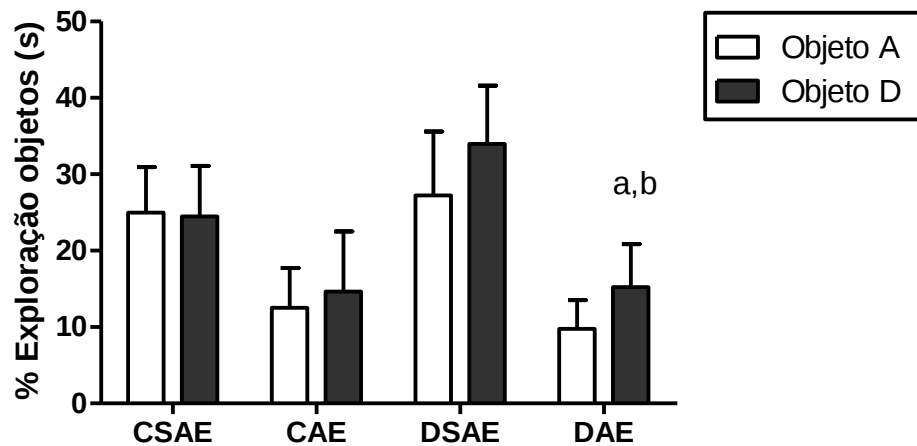


Figura 9. Efeitos tardios da desnutrição perinatal após a exposição ao ambiente enriquecido sobre a memória de reconhecimento de objetos. Aos 88 dias os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos para observar as fases da análise: teste, tempo 0 (A), período de memória de curta duração, após 180 minutos da fase inicial (B) e a fase da memória de longa duração, após 24h do teste (C). Os dados estão expressos em média ou percentual de exploração dos objetos média $\pm$ DP. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; $n = 64$; a= diferença intra-grupo, b= diferença entre grupos, three-way ANOVA, *post-hoc* Tukey.

Discussão

Estudos prévios em animais mostraram que a restrição de nutrientes durante o início da vida induz a alterações morfológicas e funcionais dos circuitos cerebrais que regulam os processos de memória e conduz a déficits de memória e aprendizado no adulto (Castro, Tracy e Rudy, 1989; Coupe *et al.*, 2009; Zhang, Li e Yang, 2010). Não se sabe, contudo, se o ambiente enriquecido na idade adulta modifica o processamento da memória nos animais desnutridos na fase perinatal e ainda se esta é uma consequência da alteração na plasticidade sináptica através do aumento na expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (*bdnf*) e do seu receptor *TrkB*. Além disso, torna-se necessário compreender se os animais desnutridos desenvolvem um comportamento ansioso e se a exposição ao ambiente enriquecido atenua tais efeitos.

No presente estudo, investigamos o efeito da desnutrição perinatal sobre a plasticidade sináptica no hipocampo de ratos adultos expostos ao ambiente enriquecido, visto que a plasticidade nessa área pode ser moldada por manipulações ambientais, tais como o ambiente enriquecido e a atividade física (Huang *et al.*, 2006; Kobilko *et al.*, 2011; Tanti *et al.*, 2012). Desse modo, realizamos uma caracterização comportamental exibida pela prole de genitoras alimentadas com uma dieta controle (caseína, 17%) ou uma dieta hipoproteica (caseína, 8%) durante a gestação e lactação e que em seguida foram alimentados pela dieta padrão do biotério Presence®, para obter informações sobre os mecanismos de plasticidade sináptica no hipocampo através do teste de memória de reconhecimento de objetos e da expressão gênica do *bdnf* e *TrkB*.

Por conseguinte, primeiro examinamos os padrões de evolução ponderal desses animais. Em seguida, foi realizado o teste para analisar a presença de ansiedade a fim de determinar se a restrição proteica precoce interfere no comportamento emocional e contribui para a presença de comportamento ansioso nesses animais. Em terceiro lugar, foi realizado o teste de memória de reconhecimento de objetos para verificar os efeitos da desnutrição e do ambiente enriquecido sobre a memória e por fim, foi realizado o PCR Real time para analisar os níveis de expressão gênica do *bdnf* e *TrkB* no hipocampo.

Os presentes resultados sugerem que o ambiente enriquecido pode favorecer a plasticidade sináptica naqueles animais que sofreram uma desnutrição perinatal através de uma maior expressão gênica do *bdnf* e seu receptor *TrkB*, bem como pela presença da memória de longa duração.

Efeitos da restrição de proteína sobre a evolução ponderal e IMC

No presente estudo, a evolução ponderal mostrou que o peso do grupo desnutrido durante a gestação e lactação foi significativamente menor do que o grupo controle do 1° até o 60° dia de vida pós-natal (teste t de student), o que corrobora com dados avaliados por outras pesquisas, nas quais o baixo peso dos filhotes que foram submetidos à desnutrição hipoproteica nas fases de gestação e lactação também foi reduzido ao longo da vida (Barros *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2007; Orozco-Solis *et al.*, 2009). Entretanto, os animais controles que foram submetidos ao ambiente enriquecido demonstraram, após 70 dias, uma perda de peso se igualando aos animais desnutridos até os 90 dias de vida. Nesse sentido, verificou-se em um estudo, que utilizou um modelo de AE por um período de 18 ou 45 dias, uma menor evolução no peso corporal no grupo exposto ao AE por um período de 45 dias comparado ao controle social (Rizzi *et al.*, 2011).

Outro estudo utilizando ratos alojados em gaiola do AE por um período de 40 dias também apresentou uma menor evolução ponderal comparado ao grupo controle sem exposição ao AE, mesmo os animais do grupo AE recebendo uma dieta com suplementação ocasional através de amendoim, pão e maçã (Moncek *et al.*, 2004), assim observado também em outro experimento com exposição ao AE durante 12 semanas (Pena *et al.*, 2009). Além do mais, a maioria dos estudos demonstra que há uma menor atividade locomotora nos animais expostos ao AE, quando comparados ao controle não expostos ao AE, identificada pelo campo aberto (Schloesser *et al.*, 2010; Kobiló *et al.*, 2011). Porém, a permanência dessa característica parece depender da idade e tempo de exposição ao AE. Assim, ratos com 21 dias expostos ao AE por 4 a 8 semanas, apresentam uma menor atividade locomotora quando comparados ao controle sem AE, porém, animais com 70 dias expostos por 4 semanas também têm uma menor distância percorrida em comparação ao controle não exposto ao AE, mas o efeito persiste por 4, 6 e 8 meses naqueles que permaneceram por 8 semanas de exposição (Amaral *et al.*, 2008). Assim, os aspectos que podem influenciar nas nossas análises e que devem ser explorados são a atividade locomotora, o consumo alimentar e um possível acúmulo maior de gordura abdominal nos grupos desnutridos.

Nossa observação de que a deficiência de proteína neonatal e a de que o grupo CAE apresentou evolução ponderal equivalente ao grupo DAE ressalta ainda a importância de se considerar o estado nutricional e o ambiente no qual o animal está inserido no mecanismo a longo prazo da programação perinatal. Assim, outras investigações acerca da atividade metabólica torna-se-iam necessárias para explicar se as modificações advindas de

alterações precoces nas fases tardias da vida sofrem influências ambientais relacionadas aos mecanismos epigenéticos, tais como acetilação de histonas ou metilação de DNA.

Efeitos da restrição de proteína e do ambiente enriquecido sobre a expressão gênica do *bdnf* e *TrkB* no hipocampo

No presente estudo, a realização do PCR em tempo real mostrou que a dieta modifica a expressão gênica do *bdnf* e *TrkB*, em que ocasionou uma menor expressão no *bdnf* e uma tendência a uma menor expressão no receptor *TrkB*; contudo adicionado à exposição ao ambiente enriquecido houve uma maior expressão no grupo controle e desnutrido. Vale ressaltar que há uma maior resposta de reatividade tanto no que se refere à expressão gênica do *bdnf* quanto do seu receptor *TrkB* no grupo desnutrido.

Embora seja um estudo gênico, os resultados deste estudo não corroboram com dados experimentais que verificaram um aumento nos níveis proteicos do BDNF em animais submetidos a uma dieta de restrição de 50% e um aumento na expressão do receptor *TrkB* (Coupe *et al.*, 2009). Entretanto, em nosso estudo não utilizamos a restrição calórica, apenas de proteína, que devido às diferenças entre mecanismos pós traducionais pode aumentar níveis gênicos, mas sem mudanças na expressão proteica desse fator neural. A utilização de métodos diferentes no que concerne à dieta empregada nos estudos pode interferir em tais resultados, uma vez que a restrição calórica pode ser diferente da restrição apenas de proteína, a qual nesse estudo apresentou um maior comprometimento nos níveis gênicos do *bdnf*.

Entretanto, a maioria dos estudos que visam a determinar os mecanismos pelos quais o ambiente enriquecido leva ao aumento na expressão gênica do *bdnf* no hipocampo, estão associados à atividade física voluntária (Kobilo *et al.*, 2011; Jurgens e Johnson, 2012; Kondo, Takei e Hirokawa, 2012). Parece, entretanto, que esse aumento está associado à plasticidade sináptica facilitada pelo AE, como verificaram através de *immunoblotting* e eletrofisiologia um aumento na expressão do CREB, fator de transcrição intrinsecamente relacionado ao BDNF e da LTP na região CA1 do hipocampo (Huang *et al.*, 2006). Adicionalmente, um experimento realizado em roedores verificou o aumento no número das espinhas dendríticas na região CA1 e DG do hipocampo, o que denota um aumento na plasticidade nos animais expostos ao AE (Zhu *et al.*, 2009). Em contrapartida, um estudo utilizando EMG no hipocampo não encontrou aumento na potenciação sináptica basal na via das fibras perfurantes do hipocampo no grupo AE (Eckert, Bilkey e Abraham, 2010), porém, houve aumento na excitabilidade celular no DG do hipocampo *in vivo*.

Além disso, outros pesquisadores vislumbraram em seus estudos que os animais que realizaram apenas atividade física involuntária apresentaram aumento na expressão do *bdnf* após a realização do PCR, enquanto o grupo ambiente enriquecido com sedentarismo não apresentou tal aumento (Bechara e Kelly, 2013), parecendo ser que a atividade física realizada no ambiente enriquecido aumenta os níveis do *bdnf* no hipocampo.

Na formação do hipocampo, observou-se comparativamente baixos níveis proteicos de NT-3 e níveis mais elevados de BDNF no grupo AE em um estudo em que os animais permaneceram dos 2 aos 12 meses alojados em um AE, verificados através do método ELISA (Ickes *et al.*, 2000). Outro estudo verificou que houve modificações na expressão gênica envolvida na formação de novas sinapses e reorganização das sinapses existentes, alteração nos níveis de genes associados a modificações que ocorrem durante o crescimento neural, bem como nos genes associados ao receptor NMDA e à excitabilidade neuronal, os quais tiveram sua expressão modificada após 3 e 6 horas diárias de exposição ao AE. A longo prazo, o AE afeta níveis de expressão de um número de genes envolvidos com a estrutura neuronal, sinalização e plasticidade sináptica. Alguns desses genes estão associados ao comportamento, memória e aprendizado (Rampon *et al.*, 2000).

Logo, a associação entre os efeitos da programação devido a fatores nutricionais e os produzidos pelo ambiente enriquecido sobre a arborização dendrítica, a plasticidade sináptica e os níveis proteicos de BDNF e do seu receptor TrkB, torna-se necessária para acrescentar dados a esse estudo, com o intuito de se verificar as mudanças morfofuncionais no hipocampo.

Mecanismos de memória de curta e longa duração em animais desnutridos e expostos ao ambiente enriquecido

Os resultados obtidos neste estudo corroboram em parte com alguns estudos que mostram a relação entre a desnutrição nos períodos precoces da vida e déficits de memória, tal como um estudo anterior, cuja desnutrição precoce resulta em diminuição na densidade de células NOS positivas na área CA1, CA3 e DG, além de déficits na aprendizagem espacial identificados pelo labirinto aquático de Morris (Zhang, Li e Yang, 2010). Além do mais, outros pesquisadores encontraram em seus experimentos que a desnutrição induziu além de déficits no peso corporal, atraso na maturação reflexa e na aquisição de padrões maduros do desenvolvimento de atividade locomotora realizados no campo aberto (Barros *et al.*, 2006). Por outro lado, um grupo de pesquisa identificou em animais que sofreram privação alimentar, consistindo em limitar o acesso do filhote ao leite removendo-o da gaiola

a partir do dia 2º dia pós-natal 12 horas por dia, que não houve diferença no desempenho durante os quatro dias de teste no labirinto aquático de Morris. Entretanto, os animais do grupo com privação alimentar passaram menos tempo no quadrante alvo (Akman *et al.*, 2004).

No nosso estudo, porém, ao avaliarmos isoladamente os grupos CSAE e DAE verificamos que os mesmos apresentaram memória de curta duração, porém, comparando-se entre grupos, observou-se que a dieta não interferiu na memória de curta ou longa duração. Contudo, verificando-se a desnutrição como um fator isolado, não houve interferência desta na memória de reconhecimento de objetos. Já com relação ao ambiente enriquecido isoladamente, o grupo DAE apresentou memória de longa duração, bem como quando comparado ao grupo CAE. Um fato que se deve ressaltar, de uma maneira geral, é que a o AE também influenciou na eficácia dessa exploração dos objetos, em que os animais os exploraram adequadamente em um menor tempo.

Desse modo, o início de exposição ao ambiente enriquecido, bem como os períodos de exposição e a frequência de troca dos utensílios parecem interferir no perfil de exploração dos objetos, bem como na plasticidade sináptica do hipocampo no adulto. Um estudo utilizando a exposição ao AE por um período de 7 a 15 dias com troca semanal dos objetos promoveu *in vivo* um aumento na excitabilidade celular no DG do hipocampo, porém não houve alteração na eficácia sináptica no DG bem como na potenciação sináptica das vias perfurantes do hipocampo (Eckert, Bilkey e Abraham, 2010), no entanto outro estudo com tempo de exposição semelhante demonstrou que houve um melhor desempenho no labirinto aquático de Morris e aumento na expressão da CREB e LTP na área CA1 do hipocampo (Huang *et al.*, 2006). Uma pesquisa expôs os ratos ao AE durante 3 horas diárias por um período de 14 dias com trocas diárias dos objetos e verificou memória de longa duração nesses animais (Bruehl-Jungerman, Laroche e Rampon, 2005). Já uma experiência de exposição ao AE durante 3 semanas com troca semanal dos utensílios promoveu maior percentual de exploração do objeto novo na memória de curta duração no grupo AE com exercício involuntário (Bechara e Kelly, 2013). Adicionalmente, outro autor utilizou exposição ao AE durante três períodos diferentes: 2, 3 e 6 semanas com troca semanal dos objetos e observou que os grupos 2 e 3 semanas apresentaram memória de curta duração na tarefa de reconhecimento de objetos, porém o grupo 6 semanas apresentou memória espacial e de trabalho na tarefa do labirinto T (Birch, McGarry e Kelly, 2013).

Além disso, um experimento com roedores fêmeas expostos ao AE durante 3 semanas, verificou aumento no desempenho no julgamento da plataforma escondida no

labirinto aquático de Morris (Kondo, Takei e Hirokawa, 2012). Estudos utilizando o labirinto aquático de Morris verificaram um menor escape de latência nos grupos AE expostos durante 25 minutos por dia, do dia 10 ao 14 após o nascimento (Zhong *et al.*, 2009) e animais expostos durante 3 meses apresentaram estratégias de navegação mais rápidas (Leggio *et al.*, 2005).

No presente estudo, utilizamos um período maior de exposição ao ambiente enriquecido, 6 semanas com troca e/ou rearranjo dos utensílios a cada 5 dias para identificar a resposta na memória de reconhecimento de objetos nos grupos controle e desnutrido sem ou com exposição ao AE. Evidenciamos, com esse tipo de exposição, resultados semelhantes aos de outros modelos experimentais mais utilizados na literatura, tais como 30 dias de exposição com aquisição de tarefa instrumental (Madronal *et al.*, 2010), 6 semanas de exposição com aumento no percentual da exploração do objeto novo na memória de curta duração (Tanti *et al.*, 2012). Um outro tipo de exposição encontrado foi por 3 ou 6 semanas com trocas semanais, com aquisição de memória de curta duração nos grupos 3 e 6 semanas e no grupo 6 semanas com memória espacial e de trabalho (Birch, McGarry e Kelly, 2013), entre outros. Essas diferenças encontradas nos resultados dos estudos decorrem possivelmente devido aos variados métodos empregados; entretanto, nossos dados são inéditos no que se refere à associação da exposição crônica ao AE em animais adultos que foram submetidos à restrição proteica durante o período crítico do desenvolvimento do SN e a expressão gênica do *bdnf* e *TrkB* bem como com relação à memória de reconhecimento de objetos em tais animais.

Demonstrou-se com os dados obtidos que mesmo havendo um período de exposição ao ambiente enriquecido menor que 6 meses, foram verificadas modificações comportamentais e moleculares nesses animais, embora dados na literatura relatem que seja necessário maior tempo de exposição para se observar modificações estruturais na formação hipocampal e como consequência, uma persistência da memória de longa duração. De fato, em ratos com 9 a 10 meses de idade e expostos ao AE por um período a partir de 6 meses e com troca semanal dos objetos, foi verificado um aumento na proliferação celular no giro denteado do hipocampo, porém, não houve diferença na sobrevivência celular no DG (Catlow *et al.*, 2009). Já um estudo utilizou animais com 4 meses de vida expostos por 2h ou 6h/dia, por 2 dias ou 14 dias ao AE com troca dos objetos a cada 12h e houve modificações na expressão gênica envolvidas na formação de novas sinapses e reorganização ou alongamento das sinapses existentes, demonstrando ocorrer plasticidade sináptica após períodos de exposição ao AE (Rampon *et al.*, 2000).

Quanto às diferenças encontradas no presente estudo em relação ao grupo DAE apresentar memória de longa duração, podemos inferir que o fator nutricional é determinante para as repercussões desse modelo no adulto. Baseados no conceito DoHaD, o AE parece favorecer ajustes fenotípicos na plasticidade sináptica no hipocampo desses organismos desnutridos precocemente direcionados à arborização dendrítica e ao aumento na expressão gênica do *bdnf* e do seu receptor *trkb*, estes encontrados em nosso estudo. De fato, estudo prévio do nosso grupo verificou que restrição de nutrientes em períodos precoces ocasionou redução na proliferação celular no DG do hipocampo adulto, porém, não impediu a diferenciação neuronal de novas células nessa região (Matos *et al.*, 2011). Além do mais, outras investigações em animais normonutridos demonstraram que a exposição ao AE ocasionou um aumento no número de neurônios no giro denteado do hipocampo e da expressão gênica do *bdnf* nessa região (Kobilo *et al.*, 2011), aumento na expressão do *bdnf*, além de células em proliferação no giro denteado hipocampal (Bechara e Kelly, 2013) e aumento no número de espinhas dendríticas nas áreas CA1 e no giro denteado do hipocampo (Zhu *et al.*, 2009).

Características de comportamento de ansiedade em animais desnutridos e expostos ao ambiente enriquecido

Um recente estudo que analisou os efeitos da desnutrição proteica durante a gestação e/ou lactação, concluiu que ratos podem apresentar maior comportamento de ansiedade a depender do período no qual ocorre o déficit nutricional (Reyes-Castro *et al.*, 2012). Desse modo, o teste de ansiedade comportamental foi realizado em nosso estudo para verificar se os nossos animais expostos ao AE desenvolveram comportamento ansioso, o que poderia estar associado ao tempo de agrupamento social, à agressividade ocasionada por este e à densidade demográfica encontrada. De fato, um estudo verificou que o fator competição por alimento foi encontrado nos animais desnutridos durante a lactação e expostos ao AE durante 30 dias, com uma atividade agressiva observada entre aqueles (Katz, Davies e Dobbing, 1982). Entretanto, no presente estudo as observações do comportamento de ansiedade indicaram que o fator dieta não provocou ansiedade. Quando comparamos os grupos CSAE e CAE, houve uma menor ansiedade no grupo CAE. Entretanto, no que se refere à tomada de decisão dos animais desnutridos expostos ao ambiente enriquecido, houve traços de ansiedade, devido a sua permanência maior no centro, o que caracteriza um conflito de decisão de qual campo explorar.

Estudos anteriores demonstraram que os animais expostos ao ambiente enriquecido apresentam uma tendência a apresentar um maior percentual de entradas no braço aberto do labirinto em cruz elevado (Pena *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2009; Tanti *et al.*, 2012), o que demonstra um traço de menor comportamento ansioso, além de um maior tempo de permanência no braço aberto (Galani *et al.*, 2007). Um outro estudo verificou que o ambiente enriquecido reverteu os efeitos do stress, em que grupos de animais controle, submetidos ao stress e stress com AE, em que foi utilizado um modelo de teste de caixa claro / escuro, demonstrou que os animais controle e AE com stress mostraram um menor comportamento ansioso, em que permaneceram um percentual de tempo maior na região clara da caixa (Schloesser *et al.*, 2010).

Parece então, que o ambiente enriquecido pode minimizar os efeitos dos eventuais comportamentos de ansiedade nesses animais, porém sem efeito naqueles desnutridos precocemente. Esse perfil comportamental encontrado em nosso estudo talvez seja devido às trocas frequentes de objetos com o aumento no interesse dos animais à exploração dos mesmos em detrimento das agressões encontradas em agrupamentos sociais, bem como à diminuição da habituação ao ambiente em que vivem. Nossa densidade demográfica também parece ter permitido uma adequada locomoção desses animais, inclusive na idade adulta.

Desse modo, compreender os mecanismos subjacentes à relação desnutrição na fase precoce da vida e os eventuais benefícios promovidos pelo ambiente enriquecido na fase adulta no que se refere à expressão gênica do *bdnf* e do receptor *TrkB*, bem como quanto à memória de reconhecimento de objetos foi o nosso objetivo. Para os indivíduos desnutridos em períodos precoces da vida, o ambiente enriquecido proporciona estímulos visual, somatossensorial, vestibular e aumento da atividade física voluntária, podendo agregar benefícios tais como a melhoria da memória e aprendizado.

Logo, o presente estudo é inédito ao apresentar a associação entre a desnutrição e a exposição ao AE, estudos de expressão gênica do *bdnf* e *Trkb* e a memória de reconhecimento de objetos. Por conseguinte, tomados em conjunto aos resultados anteriores da literatura, as nossas observações sugerem que a desnutrição perinatal pode causar déficits cognitivos e comportamentais no organismo adulto e o ambiente enriquecido pode revertê-los através do aumento na expressão gênica do *bdnf* e do seu receptor *trkb*. Dessa forma, vislumbramos com tais resultados um reforço às estratégias que visam ao favorecimento da prevenção de déficits cognitivos associados à desnutrição perinatal.

Agradecimentos

O presente trabalho foi financiado pelo CNPQ e FACEPE. Os autores agradecem à Dra. Sandra Lopes de Souza pelo espaço cedido no biotério do Anexo de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco e ao Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco pelo fornecimento dos animais para a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKMAN, C. et al. Effect of food deprivation during early development on cognition and neurogenesis in the rat. *Epilepsy Behav*, v. 5, n. 4, p. 446-54, Aug 2004.
- ALONSO, M.; MEDINA, J. H.; POZZO-MILLER, L. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem*, v. 11, n. 2, p. 172-8, Mar-Apr 2004.
- ALONSO, M. et al. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*, v. 12, n. 4, p. 551-60, 2002.
- ALONSO, M. et al. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*, v. 22, n. 5-6, p. 663-74, Dec 2002.
- AMARAL, O. B. et al. Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiol Behav*, v. 93, n. 1-2, p. 388-94, Jan 28 2008.
- ARONIADOU, V. A.; TEYLER, T. J. The role of NMDA receptors in long-term potentiation (LTP) and depression (LTD) in rat visual cortex. *Brain Res*, v. 562, n. 1, p. 136-43, Oct 18 1991.
- BARROS, K. M. et al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci*, v. 9, n. 1-2, p. 99-104, Feb-Apr 2006.
- BEAUQUIS, J. et al. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS One*, v. 5, n. 11, p. e13993, 2010.
- BECHARA, R. G.; KELLY, A. M. Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behav Brain Res*, v. 245, p. 96-100, May 15 2013.
- BEDI, K. S. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, v. 311, n. 3, p. 425-33, Sep 15 1991.
- BIRCH, A. M.; MCGARRY, N. B.; KELLY, A. M. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus*, v. 23, n. 6, p. 437-50, Jun 2013.
- BRUEL-JUNGGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, v. 21, n. 2, p. 513-21, Jan 2005.
- CASTRO, C. A.; TRACY, M.; RUDY, J. W. Early-life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory processes mediating performance in a conditional-spatial discrimination task. *Behav Brain Res*, v. 32, n. 3, p. 255-64, Apr 1 1989.

CATLOW, B. J. et al. Effects of environmental enrichment and physical activity on neurogenesis in transgenic PS1/APP mice. *Brain Res*, v. 1256, p. 173-9, Feb 23 2009.

COUPE, B. et al. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J Neuroendocrinol*, v. 21, n. 1, p. 40-8, Jan 2009.

DIAZ-CINTRA, S. et al. Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res*, v. 662, n. 1-2, p. 117-26, Oct 31 1994.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*, v. 55, p. 51-86, 2004.

ECKERT, M. J.; BILKEY, D. K.; ABRAHAM, W. C. Altered plasticity in hippocampal CA1, but not dentate gyrus, following long-term environmental enrichment. *J Neurophysiol*, v. 103, n. 6, p. 3320-9, Jun 2010.

FERNANDEZ, V. et al. NADPH-d positive neurons in the developing somatosensory cortex of the rat: effects of early and late environmental enrichment. *Brain Res Dev Brain Res*, v. 107, n. 2, p. 299-307, May 15 1998.

GALANI, R. et al. The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem*, v. 88, n. 1, p. 1-10, Jul 2007.

HE, X. P. et al. Conditional deletion of TrkB but not BDNF prevents epileptogenesis in the kindling model. *Neuron*, v. 43, n. 1, p. 31-42, Jul 8 2004.

HUANG, F. L. et al. Environmental enrichment enhances neurogranin expression and hippocampal learning and memory but fails to rescue the impairments of neurogranin null mutant mice. *J Neurosci*, v. 26, n. 23, p. 6230-7, Jun 7 2006.

ICKES, B. R. et al. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol*, v. 164, n. 1, p. 45-52, Jul 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. 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, p. 285-316, Nov 1997.

JURGENS, H. A.; JOHNSON, R. W. Environmental enrichment attenuates hippocampal neuroinflammation and improves cognitive function during influenza infection. *Brain Behav Immun*, v. 26, n. 6, p. 1006-16, Aug 2012.

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

KATZ, H. B.; DAVIES, C. A.; DOBBING, J. Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameters of the cerebrum and hippocampus in rats. *J Nutr*, v. 112, n. 7, p. 1362-8, Jul 1982.

KELLEHER, R. J., 3RD et al. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*, v. 116, n. 3, p. 467-79, Feb 6 2004.

KOBILO, T. et al. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem*, v. 18, n. 9, p. 605-9, 2011.

KONDO, M.; TAKEI, Y.; HIROKAWA, N. Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. *Neuron*, v. 73, n. 4, p. 743-57, Feb 23 2012.

LAUS, M. F. et al. Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies. *Int J Environ Res Public Health*, v. 8, n. 2, p. 590-612, Feb 2011.

LEGGIO, M. G. et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res*, v. 163, n. 1, p. 78-90, Aug 30 2005.

LI, Y. et al. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron*, v. 59, n. 3, p. 399-412, Aug 14 2008.

MADRONAL, N. et al. Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. *PLoS One*, v. 5, n. 6, p. e11130, 2010.

MATOS, R. J. et al. Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. *Neuroscience*, v. 196, p. 16-24, Nov 24 2011.

MONCEK, F. et al. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol*, v. 16, n. 5, p. 423-31, May 2004.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 26, n. 4, p. 471-83, Jun 2002.

MURER, M. G.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, v. 63, n. 1, p. 71-124, Jan 2001.

NEVES, G.; COOKE, S. F.; BLISS, T. V. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*, v. 9, n. 1, p. 65-75, Jan 2008.

ODELBERG, S. J. Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *Anat Rec B New Anat*, v. 287, n. 1, p. 25-35, Nov 2005.

OROZCO-SOLIS, R. et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav*, v. 96, n. 3, p. 481-92, Mar 2 2009.

OST'ADALOVA, I.; BABICKY, A. Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. *Physiol Res*, v. 61 Suppl 1, p. S1-7, 2012.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985.

PENA, Y. et al. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behav Brain Res*, v. 174, n. 1, p. 181-7, Nov 1 2006.

PENA, Y. et al. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, v. 34, n. 9, p. 1390-404, Oct 2009.

POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, n. 1, p. 24-32, Jan 2001.

RAMPON, C. et al. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, n. 23, p. 12880-4, Nov 7 2000.

REYES-CASTRO, L. A. et al. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int J Dev Neurosci*, v. 30, n. 1, p. 39-45, Feb 2012.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res*, v. 140, n. 1-2, p. 1-47, Mar 18 2003.

RIZZI, S. et al. Impact of environmental enrichment on neurogenesis in the dentate gyrus during the early postnatal period. *Brain Res*, v. 1415, p. 23-33, Sep 30 2011.

ROSSATO, J. I. et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem*, v. 14, n. 1, p. 36-46, January-February 2007.

SCHLOESSER, R. J. et al. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol Psychiatry*, v. 15, n. 12, p. 1152-63, Dec 2010.

SILVEIRA, A. C. et al. Neurogenesis of GABAergic cells in the retina of malnourished rats. *Int J Dev Neurosci*, v. 25, n. 5, p. 325-33, Aug 2007.

TANTI, A. et al. Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Neuropharmacology*, v. 63, n. 3, p. 374-84, Sep 2012.

VIANNA, M. R. et al. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 21, p. 12251-4, Oct 9 2001.

ZHANG, Y.; LI, N.; YANG, Z. Perinatal food restriction impaired spatial learning and memory behavior and decreased the density of nitric oxide synthase neurons in the hippocampus of adult male rat offspring. *Toxicol Lett*, v. 193, n. 2, p. 167-72, Mar 15 2010.

ZHONG, L. et al. Calmodulin activation is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Neurol Res*, v. 31, n. 7, p. 707-13, Sep 2009.

ZHU, S. W. et al. Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice. *Behav Brain Res*, v. 197, n. 2, p. 339-46, Feb 11 2009.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A constatação de que os efeitos do insulto nutricional no desenvolvimento do cérebro são de longa duração e que podem levar a modificações permanentes na aprendizagem e no comportamento do indivíduo é de suma importância, tanto em termos clínicos como experimentais, visto que a desnutrição ainda é um problema mundial que afeta milhões de indivíduos nas fases mais vulneráveis do desenvolvimento do SN, principalmente em países subdesenvolvidos. Em contrapartida, o ambiente enriquecido surge como uma alternativa terapêutica que pode minimizar os efeitos da desnutrição precoce e facilitar os mecanismos de memória e aprendizado através da reorganização da circuitaria sináptica e um maior nível de fatores tróficos, como o BDNF.

Desse modo, compreender os mecanismos subjacentes à relação desnutrição na fase precoce da vida e os eventuais benefícios promovidos pelo ambiente enriquecido na fase adulta foi o nosso objetivo. Para a criança desnutrida em períodos precoces da vida, o ambiente enriquecido proporciona estímulos visual, somatosensorial, vestibular, aumento da atividade física involuntária e pode agregar benefícios tais como a melhoria da memória e aprendizado, bem como a diminuição da ansiedade.

Assim, apesar de muitos estudiosos utilizarem o modelo experimental de desnutrição proteica perinatal e outros pesquisadores investigarem os efeitos do ambiente enriquecido sobre a formação hipocampal, as repercussões da desnutrição perinatal no hipocampo em animais expostos ao ambiente enriquecido no que se refere ao estudo da expressão gênica do *bdnf* e *TrkB* no hipocampo e avaliação da memória de reconhecimento de objetos ainda não haviam sido detalhadamente exploradas. Esse trabalho demonstrou que o ambiente enriquecido em modelos experimentais de desnutrição precoce promove efeitos diversos, como uma maior expressão gênica do *bdnf* e do seu receptor *TrkB* no hipocampo, facilitação da memória de curta e longa duração, além de um menor comportamento de ansiedade nesses animais. Essas modificações provavelmente se dão devido à plasticidade sináptica, que pode promover esses mecanismos moleculares, além de alterações anátomo funcionais no hipocampo.

Entretanto, as alterações morfológicas e estruturais capazes de justificar tais alterações comportamentais ainda precisam ser exploradas. Para tanto, as nossas perspectivas futuras são as de realização de imunohistoquímica para verificar se houve neurogênese no giro denteado do hipocampo, o que pode favorecer a plasticidade sináptica. Além disso, é necessário verificar os níveis de síntese proteica do BDNF nessa região pelo método de immunoblotting. Outra necessidade a ser investigada é compreender

quais são os mecanismos moleculares, como os epigenéticos, que podem esclarecer como ocorrem as interações ambientais na regulação tardia dos processos de memória e aprendizado, tais como acetilação de histonas e metilaç.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKMAN, C. et al. Effect of food deprivation during early development on cognition and neurogenesis in the rat. *Epilepsy Behav*, v. 5, n. 4, p. 446-54, Aug 2004.
- ALONSO, M. et al. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn Mem*, v. 12, n. 5, p. 504-10, Sep-Oct 2005.
- ALONSO, M.; MEDINA, J. H.; POZZO-MILLER, L. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem*, v. 11, n. 2, p. 172-8, Mar-Apr 2004.
- ALONSO, M. et al. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*, v. 12, n. 4, p. 551-60, 2002.
- ALONSO, M. et al. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*, v. 22, n. 5-6, p. 663-74, Dec 2002.
- AMARAL, O. B. et al. Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiol Behav*, v. 93, n. 1-2, p. 388-94, Jan 28 2008.
- ARONIADOU, V. A.; TEYLER, T. J. The role of NMDA receptors in long-term potentiation (LTP) and depression (LTD) in rat visual cortex. *Brain Res*, v. 562, n. 1, p. 136-43, Oct 18 1991.
- BALU, D. T.; LUCKI, I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 33, n. 3, p. 232-52, Mar 2009.
- BAROUKI, R. et al. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ Health*, v. 11, p. 42, 2012.
- BARROS, K. M. et al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci*, v. 9, n. 1-2, p. 99-104, Feb-Apr 2006.
- BEAUQUIS, J. et al. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS One*, v. 5, n. 11, p. e13993, 2010.
- BECHARA, R. G.; KELLY, A. M. Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behav Brain Res*, v. 245, p. 96-100, May 15 2013.

BEDI, K. S. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, v. 311, n. 3, p. 425-33, Sep 15 1991.

BEGENISIC, T. et al. Environmental enrichment decreases GABAergic inhibition and improves cognitive abilities, synaptic plasticity, and visual functions in a mouse model of Down syndrome. *Front Cell Neurosci*, v. 5, p. 29, 2011.

BIRCH, A. M.; MCGARRY, N. B.; KELLY, A. M. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus*, v. 23, n. 6, p. 437-50, Jun 2013.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, v. 21, n. 2, p. 513-21, Jan 2005.

CASTRO, C. A.; TRACY, M.; RUDY, J. W. Early-life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory processes mediating performance in a conditional-spatial discrimination task. *Behav Brain Res*, v. 32, n. 3, p. 255-64, Apr 1 1989.

CATLOW, B. J. et al. Effects of environmental enrichment and physical activity on neurogenesis in transgenic PS1/APP mice. *Brain Res*, v. 1256, p. 173-9, Feb 23 2009.

CHOI, S. H. et al. Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF. *Mol Neurodegener*, v. 4, p. 52, 2009.

COUPE, B. et al. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J Neuroendocrinol*, v. 21, n. 1, p. 40-8, Jan 2009.

CUNHA, C.; BRAMBILLA, R.; THOMAS, K. L. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*, v. 3, p. 1, 2010.

DIAZ-CINTRA, S. et al. Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res*, v. 662, n. 1-2, p. 117-26, Oct 31 1994.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*, v. 55, p. 51-86, 2004.

ECKERT, M. J.; BILKEY, D. K.; ABRAHAM, W. C. Altered plasticity in hippocampal CA1, but not dentate gyrus, following long-term environmental enrichment. *J Neurophysiol*, v. 103, n. 6, p. 3320-9, Jun 2010.

EHNINGER, D. et al. Enriched environment and physical activity reduce microglia and influence the fate of NG2 cells in the amygdala of adult mice. *Cell Tissue Res*, v. 345, n. 1, p. 69-86, Jul 2011.

FERNANDEZ, V. et al. NADPH-d positive neurons in the developing somatosensory cortex of the rat: effects of early and late environmental enrichment. *Brain Res Dev Brain Res*, v. 107, n. 2, p. 299-307, May 15 1998.

FINKBEINER, S. et al. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, v. 19, n. 5, p. 1031-47, Nov 1997.

FRANK, L. et al. BDNF down-regulates neurotrophin responsiveness, TrkB protein and TrkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, v. 8, n. 6, p. 1220-30, Jun 1996.

FURINI, C. R. et al. Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus*, v. 20, n. 5, p. 672-83, May 2010.

GALANI, R. et al. The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem*, v. 88, n. 1, p. 1-10, Jul 2007.

GEORGIEFF, M. K. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *Am J Clin Nutr*, v. 85, n. 2, p. 614S-620S, Feb 2007.

GHOSH, A.; CARNAHAN, J.; GREENBERG, M. E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*, v. 263, n. 5153, p. 1618-23, Mar 18 1994.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*, v. 305, n. 5691, p. 1733-6, Sep 17 2004.

HAAPASALO, A. et al. Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *J Biol Chem*, v. 277, n. 45, p. 43160-7, Nov 8 2002.

HAGG, T. From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist*, v. 15, n. 1, p. 20-7, Feb 2009.

HE, X. P. et al. Conditional deletion of TrkB but not BDNF prevents epileptogenesis in the kindling model. *Neuron*, v. 43, n. 1, p. 31-42, Jul 8 2004.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, v. 24, p. 677-736, 2001.

_____. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*, v. 72, p. 609-42, 2003.

HUANG, F. L. et al. Environmental enrichment enhances neurogranin expression and hippocampal learning and memory but fails to rescue the impairments of neurogranin null mutant mice. *J Neurosci*, v. 26, n. 23, p. 6230-7, Jun 7 2006.

ICKES, B. R. et al. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol*, v. 164, n. 1, p. 45-52, Jul 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. 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, p. 285-316, Nov 1997.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*, v. 103, n. 1, p. 1-11, Aug 1999.

JAHNKE, S.; BEDI, K. S. Undernutrition during early life increases the level of apoptosis in the dentate gyrus but not in the CA2+CA3 region of the hippocampal formation. *Brain Res*, v. 1143, p. 60-9, Apr 27 2007.

JANKOWSKY, J. L. et al. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, v. 25, n. 21, p. 5217-24, May 25 2005.

JOVANOVIĆ, J. N. et al. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci*, v. 3, n. 4, p. 323-9, Apr 2000.

JURGENS, H. A.; JOHNSON, R. W. Environmental enrichment attenuates hippocampal neuroinflammation and improves cognitive function during influenza infection. *Brain Behav Immun*, v. 26, n. 6, p. 1006-16, Aug 2012.

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

KATZ, H. B.; DAVIES, C. A.; DOBBING, J. Effects of undernutrition at different ages early in life and later environmental complexity on parameters of the cerebrum and hippocampus in rats. *J Nutr*, v. 112, n. 7, p. 1362-8, Jul 1982.

KELLEHER, R. J., 3RD et al. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*, v. 116, n. 3, p. 467-79, Feb 6 2004.

KEMPERMANN, G. et al. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, v. 130, n. 2, p. 391-9, Jan 2003.

KOBILO, T. et al. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem*, v. 18, n. 9, p. 605-9, 2011.

KONDO, M.; TAKEI, Y.; HIROKAWA, N. Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. *Neuron*, v. 73, n. 4, p. 743-57, Feb 23 2012.

LAUS, M. F. et al. Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies. *Int J Environ Res Public Health*, v. 8, n. 2, p. 590-612, Feb 2011.

- LEGGIO, M. G. et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res*, v. 163, n. 1, p. 78-90, Aug 30 2005.
- LI, Y. et al. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron*, v. 59, n. 3, p. 399-412, Aug 14 2008.
- MA, Y. L. et al. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *Neuroscience*, v. 82, n. 4, p. 957-67, Feb 1998.
- MADRONAL, N. et al. Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. *PLoS One*, v. 5, n. 6, p. e11130, 2010.
- MARTIN, S. J.; GRIMWOOD, P. D.; MORRIS, R. G. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci*, v. 23, p. 649-711, 2000.
- MATOS, R. J. et al. Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. *Neuroscience*, v. 196, p. 16-24, Nov 24 2011.
- MAURAGE, C. Children's nutrition and health in adulthood. *Appetite*, v. 51, n. 1, p. 22-4, Jul 2008.
- MESA-GRESA, P.; PEREZ-MARTINEZ, A.; REDOLAT, R. Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. *Aggress Behav*, v. 39, n. 4, p. 269-79, Jul-Aug 2013.
- MONCEK, F. et al. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol*, v. 16, n. 5, p. 423-31, May 2004.
- MONTEIRO, J. S. et al. Psychosocial stimulation and brain plasticity in malnourished individuals. *Rev. bras. saúde matern. infant*, v. 1, p. 15-22, 2002.
- MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 26, n. 4, p. 471-83, Jun 2002.
- MOWLA, S. J. et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*, v. 276, n. 16, p. 12660-6, Apr 20 2001.
- MURER, M. G.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, v. 63, n. 1, p. 71-124, Jan 2001.
- NEVES, G.; COOKE, S. F.; BLISS, T. V. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*, v. 9, n. 1, p. 65-75, Jan 2008.

- ODELBERG, S. J. Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *Anat Rec B New Anat*, v. 287, n. 1, p. 25-35, Nov 2005.
- OLSON, A. K. et al. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus*, v. 16, n. 3, p. 250-60, 2006.
- OROZCO-SOLIS, R. et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav*, v. 96, n. 3, p. 481-92, Mar 2 2009.
- OST'ADALOVA, I.; BABICKY, A. Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. *Physiol Res*, v. 61 Suppl 1, p. S1-7, 2012.
- OZANNE, S. E. et al. Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. *Clin Sci (Lond)*, v. 106, n. 2, p. 141-5, Feb 2004.
- PANG, T. Y.; HANNAN, A. J. Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology*, v. 64, p. 515-28, Jan 2013.
- PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. *J Nutr*, v. 140, n. 3, p. 658-61, Mar 2010.
- PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985.
- PENA, Y. et al. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behav Brain Res*, v. 174, n. 1, p. 181-7, Nov 1 2006.
- PENA, Y. et al. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, v. 34, n. 9, p. 1390-404, Oct 2009.
- POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, n. 1, p. 24-32, Jan 2001.
- RAMPON, C. et al. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, n. 23, p. 12880-4, Nov 7 2000.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993.
- REYES-CASTRO, L. A. et al. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int J Dev Neurosci*, v. 30, n. 1, p. 39-45, Feb 2012.

- RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 25, n. 4, p. 835-53, May 2001.
- RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res*, v. 140, n. 1-2, p. 1-47, Mar 18 2003.
- RIZZI, S. et al. Impact of environmental enrichment on neurogenesis in the dentate gyrus during the early postnatal period. *Brain Res*, v. 1415, p. 23-33, Sep 30 2011.
- ROJAS, J. J. et al. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Exp Neurol*, v. 241, p. 25-33, Mar 2013.
- ROSSATO, J. I. et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem*, v. 14, n. 1, p. 36-46, January-February 2007.
- SANTOS, A. G. et al. Late repercussions of intra uterus and postnatal nutritional disturbances. *Pediatrics (São Paulo)*, v. 25, n. (1/2), p. 43-50, 2003.
- SCHLOESSER, R. J. et al. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol Psychiatry*, v. 15, n. 12, p. 1152-63, Dec 2010.
- SILVEIRA, A. C. et al. Neurogenesis of GABAergic cells in the retina of malnourished rats. *Int J Dev Neurosci*, v. 25, n. 5, p. 325-33, Aug 2007.
- TANTI, A. et al. Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Neuropharmacology*, v. 63, n. 3, p. 374-84, Sep 2012.
- TONGIORGI, E. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neurosci Res*, v. 61, n. 4, p. 335-46, Aug 2008.
- TONI, N. et al. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci*, v. 10, n. 6, p. 727-34, Jun 2007.
- VAN DEN BERGH, B. R. H. Developmental programming of early brain and behaviour development and mental health: a conceptual framework. *Developmental Medicine & Child Neurology*, v. 53 (Suppl. 4), p. 19-23, 2011.
- VIANNA, M. R. et al. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 21, p. 12251-4, Oct 9 2001.
- WILLIAMSON, L. L.; CHAO, A.; BILBO, S. D. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain Behav Immun*, v. 26, n. 3, p. 500-10, Mar 2012.

ZAGAAR, M. et al. Regular treadmill exercise prevents sleep deprivation-induced disruption of synaptic plasticity and associated signaling cascade in the dentate gyrus. *Mol Cell Neurosci*, Jul 30 2013.

ZAGREBELSKY, M.; KORTE, M. Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses. *Neuropharmacology*, Jun 8 2013.

ZHANG, Y.; LI, N.; YANG, Z. Perinatal food restriction impaired spatial learning and memory behavior and decreased the density of nitric oxide synthase neurons in the hippocampus of adult male rat offspring. *Toxicol Lett*, v. 193, n. 2, p. 167-72, Mar 15 2010.

ZHONG, L. et al. Calmodulin activation is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Neurol Res*, v. 31, n. 7, p. 707-13, Sep 2009.

ZHU, S. W. et al. Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice. *Behav Brain Res*, v. 197, n. 2, p. 339-46, Feb 11 2009.