UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

e

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS JOVENS E ADULTOS.

DEUSA APARECIDA VENDITE

Orientador

DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA

Tese apresentada ao Curso de Pos-Graduação em Bioquímica, Setor Ciências Biológicas da Universidade do Paraná, em convênio com o Curso de Pos-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Curitiba 1988

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Diogo pela paciência e amor que sempre existiu na realização deste trabalho.

Ao meu querido amigo Alex por ter aceito a coorientação desta tese.

À Beti e a Léo pela força que sempre me deram na realização dos meus projetos de vida.

À Suka por ter acreditado em mim e no Diogo.

Ao Carlos, Jackson, João, Leandro, Ronaldo, Suka e Virginia por terem participado em vários experimentos.

Ao João pelo auxílio na estatística e na publicação dos artigos.

Ao Dutra e aos demais integrandes do Lab. 1 pela grande ajuda e paciência.

Ao Alex e Clovis pela correção e revisão dos originais.

Ao Afonso pelo auxílio nos gráficos.

À Coordenação do Curso de Pos-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, por ter oportunizado a realização deste trabalho.

Ao CNPq, FINEP e a PROPESP - UFRGS pelo auxílio à pesquisa.

Enfim, a todos os integrantes do Departamento de Bioquímica - UFRGS que de alguma forma tornaram possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

Desenvolvimento cerebral 01

Desnutrição e desenvolvimento 03

Desnutrição e sistemas hormonais e de neurotransmissores 05

Desnutrição e comportamento 07

Desnutrição e incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais 09

Sistema B-endorfinérgico - Geral 11

Fisiologia do sistema B-endorfinérgico 13

Desenvolvimento do sistema B-endorfinérgico 17

Objetivos 20

MATERIAL E MÉTODOS

Método de desnutrição 21

Análise Comportamental 23

Tratamento farmacológico 26

Medida do reflexo de retirada da cauda 26

Determinação da incorporação de $^{14}C_1$-leucina em proteínas 27

Medida da imunorreatividade tipo B - endorfina 30

Dosagem de DNA, RNA e proteínas 31

Grupos de estudo 31

Análise estatística 32

RESULTADOS

Experimento 1: Caracterização do método de desnutrição. 34

Experimento 2: Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a incorporação de $^{14}C_1$ - leucina em proteínas estruturas cerebrais em ratos adultos submetidos a sessão de choques. 38

Experimento 3: Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a medida da imunorreatividade tipo B-endorfina em ratos adultos submetidos a diferentes tipos de treinos. 41

Experimento 4: Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre o comportamento de ratos adultos injetados com B-endorfina logo após o treino. 44

Experimento 5: Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre nocicepção em ratos adultos submetidos a uma sessão de habituação ao campo aberto. 56

Experimento 6: Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo de ratos com 21 dias de idade submetidos a diferentes tipos de treinos. 58

Experimento 7: Efeito da separação da mãe sobre a imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo de ratos normais e desnutridos com 21 dias de idade. 61

Experimento 8: Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre o comportamento de ratos com 21 dias de idade injetados com B-endorfina logo após diferentes tipos de treinos. 63

Experimento 9: Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a nocicepção em ratos com 21 dias de idade submetidos a uma sessao de habituação ao campo aberto. 77

DISCUSSÃO 79

CONCLUSÕES 103

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 105

ÍNDICE DE TABELAS

1 . Composição das dietas 22

2 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre o peso corporal e cerebral de ratos com 21 dias e 3 meses de idade 35

3 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre peso, conteúdo de DNA, RNA e proteínas de estruturas cerebrais em ratos com 21 dias de idade 36

4 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre peso, conteúdo de DNA, RNA e proteínas de estruturas cerebrais em ratos com 3 meses de idade 37

5 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a latência de resposta de fuga ao choque com 0,8 mA em ratos adultos 39

6 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a incorporação de $^{14}C_1$ - leucina em proteínas de estruturas cerebrais em ratos adultos, 4 horas após uma sessão de choques com 0,8 mA 40

7 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo de ratos adultos submetidos à esquiva inibitória (0,2 mA) 42

8 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo de ratos submetidos a uma sessão de fuga ao choque com 0,8 mA 43

9 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a latência da resposta de fuga ao choque em ratos adultos submetidos a uma sessão de esquiva ativa de duas vias usando 0,2 ou 0,8 mA 45

10 . Efeito do aumento na intensidade de choque em esquiva ativa de duas vias e na esquiva inibitória. 53

11 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a resposta antinociceptiva induzida pela exposição ao campo aberto em ratos adultos 57

12 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo de ratos com 21 dias de idade submetidos à esquiva inibitória. 59

13 . Efeito da desnutrição durante oa aleitamento sobre a imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo de ratos com 21 dias de idade submetidos a uma sessão de habituação ao campo aberto. 60

14 . Efeito da separação maternal (desmame) sobre a imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo de ratos normais e desnutridos com 21 dias de idade. 62

15 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre a latência de resposta de fuga ao choque de ratos com 21 dias de idade submetidos a uma sessão de esquiva ativa de duas vias com 0,2 mA ou 0,8 mA. 64

16 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre nocicepção de ratos com 21 dias de idade submetidos a uma sessão de habituação ao campo aberto. 78

ÍNDICE DE FIGURAS

1 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de esquiva em ratos adultos submetidos à esquiva ativa de duas vias usando 0,2 mA 47

2 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de esquiva em ratos adultos submetidos à esquiva ativa de duas vias usando 0,8 mA 48

3 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre a latência de descida da plataforma em ratos adultos submetidos à esquiva inibitória usando 0,2 mA 51

4 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre a latência de descida da plataforma em ratos adultos submetidos à esquiva inibitória usando 0,8 mA 52

5 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pos-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de orientação em ratos adultos submetidos ao campo aberto 55

6 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de esquiva em ratos de 21 dias de idade submetidos à esquiva ativa de duas vias usando 0,2 mA 66

7 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de esquiva em ratos de 21 dias de idade submetidos à esquiva ativa de duas vias usando 0,8 mA 67

8 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina (1ug/Kg) sobre a latência de descida da plataforma em ratos de 21 dias de idade submetidos à esquiva inibitória usando 0,2 mA 70

9 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina (1 ug/Kg) sobre a latência de descida da plataforma em ratos de 21 dias de idade submetidos à esquiva inibitória usando 0,8 mA 71

10 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina (2 ug/Kg) sobre a latência de descida da plataforma em ratos de 21 dias de idade submetidos à esquiva inibitória usando 0,2 mA 73

11 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina (2 ug/Kg) sobre a latência de descida da plataforma em ratos de 21 dias de idade submetidos à esquiva inibitória usando 0,8 mA 75

12 . Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da adminstração pós-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de orientação em ratos de 21 dias de idade submetidos ao campo aberto 76

Resumo

No rato, o período de maior desenvolvimento cerebral compreende as primeiras 3 semanas de vida. Interferências ambientais, nutricionais e farmacológicas nesta fase podem causar alterações neuroquímicas e comportamentais irreversíveis. Sabe-se que uma tarefa comportamental provoca em ratos adultos normais várias alterações neuroquímicas, as quais são devidas à novidade e/ou estresse decorrente do treino. Entre as várias respostas neuroquímicas causadas pelo treino, teríamos o aumento na incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais e liberação B-endorfina do hipotálamo. Além disso, uma tarefa comportamental provoca também uma resposta analgésica (antinociceptiva) nos animais. Por outro lado, ratos normais adultos injetados com B-endorfina logo após uma tarefa comportamental apresentam amnésia desta dada tarefa. Nesta tese estudou-se o efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre as respostas neuroquímicas e analgésica desencadeadas pelo treino. Além disso, do ponto de vista farmacológico, foi estudado o efeito da administração pós-treino de B-endorfina sobre a memória dos ratos desnutridos. Com exceção a incorporação de aminoácido em proteínas, os demais experimentos foram realizados em ratos com 21 dias de idade. Aos 21 dias de idade tanto os ratos normais como os desnutridos não apresentaram liberação de B-endorfina do hipotálamo, resposta analgésica induzida pelo treino e efeito amnésico da B-endorfina. Nesta idade, os ratos desnutridos apresentaram um desempenho diferente nas tarefas comportamentais analisadas quando comparados com os ratos normais. Os ratos adultos desnutridos durante o aleitamento não apresentaram aumento na incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais, liberação de B-endorfina do hipotálamo e resposta analgésica quando submetidos a uma tarefa comportamental. Além disso, os ratos adultos desnutridos apresentaram uma diminuição no nível basal de B-endorfina hipotalâmica e a injecao de B-endorfina pós-treino não provocou amnésia nestes animais. Nesta idade, não foram observadas diferenças no desempenho entre os grupos nutricionais nas tarefas comportamentais analisadas. A única diferença comportamental apresentada pelos ratos desnutridos adultos foi uma maior reatividade ao choque. Logo, os efeitos comportamentais devidos à desnutrição durante o aleitamento foram revertidos pela reabilitação nutricional e/ou desenvolvimento. Portanto, as demais alterações encontradas nos ratos desnutridos adultos são fenômenos não reversíveis pela reabilitacao nutricional.

TRABALHOS PUBLICADOS COM DADOS DESTA TESE

I- VENDITE, D.; WOFCHUCK, S.; SOUZA, D.O. Effects of undernutrition during suckling on footshock escape and on related neurochemical parameters. **Journal of Nutrition** 115: 1418-1424, 1985.

II- VENDITE, D.; ROCHA, J.B.T.; MELLO, C.F.; SOUZA, D.O. Effects of undernutrition during suckling and of post-training B-endorphin administration on avoidance performances of adult rats. **Brazilian Journal Medical Biology Research** 20: 731-740, 1987.

III- VENDITE, D.; ROCHA, J.B.T.; SOUZA, D.O. Effects of undernutrition during suckling and of novelty on hypothalamic B-endorphin immunoreactivity in young rats. **Brazilian Journal Medical Biology Research** 20: 453-455, 1987.

IV- VENDITE, D.; ROCHA, J.B.T.; SOUZA, D.O. Effects of undernutrition during suckling and avoidance training on the hypotalamic B-endorphin of young and adult rats. **Peptides** 9(4): 1988 (in press).

V- VENDITE, D.; ROCHA, J.B.T.; SOUZA, D.O. Effects of undernutrition during suckling on nociception in young and adult rats submitted to open field. (submetido)

INTRODUÇÃO

DESENVOLVIMENTO CEREBRAL

O desenvolvimento de qualquer órgão, incluindo o cérebro, procede por um aumento no número e tamanho das células. O crescimento pode ser dividido em 3 fases: inicialmente há uma fase hiperplásica, na qual ocorre um aumento na síntese de DNA refletindo um aumento no número de células, apesar do tamanho das mesmas permanecer constante. Na fase seguinte ocorre hiperplasia e hipertrofia. As células continuam a aumentar em número, aumentando também em tamanho. Finalmente, cessa a fase hiperplásica e continua a fase hipertrófica; as células só aumentam em tamanho, ou, como no caso do sistema nervoso, ocorre ainda diferenciação celular (192). Análises do conteúdo cerebral de DNA e de proteínas tem mostrado que o crescimento do cérebro de rato, do nascimento ate o décimo terceiro dia pós-natal, ocorre exclusivamente por hiperplasia, e entre o décimo terceiro e o décimo sétimo dia por hiperplasia e hipertrofia e, após o décimo sétimo dia, somente por hipertrofia (192). Contudo, o cérebro não é um órgão homogêneo, sendo composto de regiões com características diversas. Assim, o período em que ocorrem estas 3 fases do desenvolvimento não é necessáriamente o mesmo para as diferentes regiões. O nascimento dos ratos se dá numa fase de transição entre o fim da fase de maior proliferação neuronal e o início de proliferação glial. O aumento no número de células durante a fase pré-natal é principalmente devido à neurogênese e, pós-natal, devido à gliogênese, apesar de uma

pequena multiplicação neuronal (microneurônios) ocorrer na fase pós-natal. A maioria das regiões cerebrais segue este padrão de desenvolvimento, com exceção do cerebelo que apresenta neurogênese e gliogênese no período pós-natal (190). O aparecimento de neurônios em uma dada estrutura durante a fase pós-natal se deve também a migração neuronal de uma região para outra (42). Na fase pós-natal ocorrem outros fenômenos importantes do desenvolvimento, tais como mielinizacão (40, 44) e sinaptogênese (4). A mielinização ocorre em diferentes momentos nas diversas áreas cerebrais e é precedida por proliferação de oligodendrócitos (20). Assim, a mielinização é em parte dependente da proliferação celular.

O papel de hormônios e neurotransmissores sobre o desenvolvimento cerebral tem sido estudado. Um grande número de hormônios, incluindo hormônio da tireóide, hormônio de crescimento, corticosteróide, estrógenos e endorfinas afetam o desenvolvimento cerebral (47, 101). Como exemplo poderia ser citado a ação de corticosteróide durante o rápido desenvolvimento cerebral. Durante este período, o excesso de corticosteróide provoca uma diminuição no crescimento celular, caracterízada por uma diminuição na divisão celular. A arborização dendrítica também esta diminuída em muitas áreas cerebrais. Além disso, estes efeitos parecem ser seletivos em relação à região cerebral e tipos de células. O cerebelo seria mais afetado que o cortex cerebral, e as células glias mais que os neurônios. Existe um período de tempo específico para a ação destes hormônios sobre o desenvolvimento cerebral e este período varia para cada hormônio. Portanto, embora estes hormônios tenham efeitos sobre as células

de cérebro adulto, as ações destas substâncias sobre as células em desenvolvimento são diferentes (47, 101).

DESNUTRIÇÃO E DESENVOLVIMENTO

No rato, a fase de rápido desenvolvimento cerebral se dá durante a fase lactacional, sendo considerado o período de maior vulnerabilidade do desenvolvimento cerebral (45, 46). Nesta fase, o cérebro aumenta de peso rapidamente. Sabe-se que interferências nutricionais (37, 109, 145), ambientais (38, 108), tratamento com drogas (124, 154, 194), entre outras, durante este período de maior vulnerabilidade do desenvolvimento cerebral acarretam alterações irreversíveis no animal. Uma das questões a ser respondida é se estas alterações irreversíveis são realmente deletéreas para o animal ou se mecanismos de plasticidade compensam estas alterações.

A extensão dos efeitos da desnutrição é dependente da duração e do período em que o estresse nutricional é imposto ao animal, pois a desnutrição pode ser imposta durante a fase gestacional e/ou lactacional e/ou pós-lactacional. Vários métodos são utilizados para produzir desnutrição: redução da quantidade de alimento fornecido para a mãe, aumento no número de filhotes, redução do conteúdo proteico da dieta, separação da mãe por alguns períodos do dia, etc (37, 109).

Os efeitos da desnutrição são devidos não somente a fatores nutricionais, mas também a fatores psico-sociais, pois a mãe desnutrida comporta-se de modo diferente da mãe que tenha sido

adequadamente alimentada (38, 120).

De acordo com o que foi relatado no item desenvolvimento cerebral, é de esperar que a desnutrição pós-lactacional reduza principalmente o tamanho celular. A desnutrição lactacional afeta mais a gliogênese do que a neurogênese, enquanto a desnutrição na fase gestacional pode prejudicar principalmente a neurogênese. Se a desnutrição for gestacional e lactacional haverá maiores reduções do número de células, pois afetará a gliogênese e a neurogênese.

Vários autores, usando diferentes métodos de desnutrição durante a lactação, mostraram que os ratos desnutridos aos 21 dias de idade apresentam um menor peso corporal e cerebral, e este efeito não é totalmente revertido após a reabilitação nutricional (46,192). As análises de DNA, RNA e proteína de cérebro total mostraram que a desnutrição altera permanentemente estes parâmetros, apesar destas alterações serem maiores aos 21 dias de idade (192). As análises de regiões cerebrais mostra que o hipocampo apresenta uma discreta diminuição no conteúdo de DNA, mas a relação proteína/DNA não é afetada; no tronco cerebral não é observada alteração no conteúdo de DNA, mas a relação proteína/DNA esta aumentada aos 21 dias (54). Outro estudo, no qual os animais foram submetidos à desnutrição gestacional e lactacional, mostrou que os ratos adultos apresentam um menor conteúdo de células no fornix, septo e hipocampo (89). Outros trabalhos mostraram que a migração de células para o hipocampo e bulbo olfatório é mais lenta em ratos desnutridos (42).

A mielinização no rato começa em torno da segunda semana pós-natal e alcança um pico de velocidade aos 20 dias (132),

declinando rapidamente para os níveis de adulto. Vários estudos mostram que a desnutrição durante o período lactacional provoca alterações permanentes nos processos de mielinização: redução do conteúdo de colesterol no cérebro (44, 169), menor espessura da bainha de mielina (103) e um retardo na maturação de glioblastos para oligodendrócitos (151).

A desnutrição influência a sinaptogênese, pois este fenômeno também ocorre na fase de rápido desenvolvimento cerebral (4). De um modo geral, a desnutrição provoca uma diminuição no comprimento dos processos dendríticos e axonais, e também uma diminuição no número de sinapses por neurônio (34, 59). Contudo, diferenças existem dependendo da região analisada. Estas alterações são mais pronunciadas no cerebelo, e o cortex cerebral e as regiões subcorticais são as menos afetadas (97). Um estudo qualitativo de cortex ocipital mostrou que ratos desnutridos durante as fases gestacional e lactacional apresentam, aos 20 dias de idade, uma maior porcentagem de junções sinápticas imaturas, as quais persistiam mesmo após a reabilitação nutricional, apenas em menor extensão (88).

DESNUTRIÇÃO E SISTEMAS HORMONAIS E DE NEUROTRANSMISSORES.

A desnutrição diminui os níveis de acetilcolina no cérebro, os quais retornam aos níveis normais após a reabilitação nutricional (102). A atividade da colina-acetil-transferase esta reduzida inicialmente (2, 160) e, mesmo com a continuidade da desnutrição, retorna a atividade normal (160). O número de

receptores muscarínicos esta diminuido em hipotálamo e striatum e aumentado em cérebro médio, mas a afinidade entre acetilcolina e estes receptores não esta alterada (189). Os níveis cerebrais de catecolaminas em ratos jovens desnutridos, podem diminuir (119, 160, 162), aumentar (174) ou permanecer inalterados (169). A reabilitação nutricional reverte este efeito (119, 160). O conteúdo cerebral de GABA apresenta-se diminuido (146) e este efeito e revertido com o desenvolvimento cerebral (139). Já os níveis de serotonina estão aumentados na maioria dos estudos (71, 169, 174).

O fato dos níveis de determinados neurotransmissores terem retornado aos níveis normais não significa que estes sistemas nos ratos desnutridos tenham a mesma responsividade que nos ratos normais, pois mudanças no "turnover" tem sido relatadas (189). Além disso, alterações no número de receptores tem sido sugeridas como uma possível explicação para a baixa sensibilidade a determinadas doses de agonistas e antagonistas desses sistemas (25, 62, 66, 96, 105). Mudanças na afinidade entre agonista e receptor não tem sido relatadas (96).

Tem sido avaliados os níveis de corticosteróides plasmáticos antes e após determinados tipos de estresse. Ratos jovens desnutridos apresentam um maior nível basal de corticosteróides plasmáticos (3, 161, 183, 188) e podem apresentar uma menor (161, 58) ou maior (188) resposta ao estresse. Os ratos adultos submetidos à reabilitação nutricional apresentam níveis normais de corticosteróides, mas a menor responsividade ao estresse continua (3, 16).

Como pode ser visto nas citações acima, as alterações

induzidas pela desnutrição sobre os sistemas hormonais e de neurotransmissores são contraditórias. Provavelmente, estas divergências se devem aos diferentes métodos de produzir desnutrição, regiões do cérebro analisada, idade dos animais, tempo de reabilitação nutricional e a maneira de expressão dos resultados (189).

DESNUTRIÇÃO E COMPORTAMENTO

Embora exista uma vasta literatura sobre desnutrição e comportamento, até o momento é difícil de se chegar a uma conclusão sobre os efeitos comportamentais da desnutrição. As discrepâncias dos resultados provavelmente são devidas à falta de uniformidade dos métodos de desnutrição, diferentes períodos de reabilitação nutricional (quando ocorre), falta de uniformidade nas tarefas comportamentais (ex: diferentes intensidades de choques, número de provas, número de sessões, etc.) e variação na idade dos animais.

O desempenho de um animal num dado treino é consequência de processos associativos e não associativos (9, 50, 61). Um dos aspectos importantes entre os processos não associativos são os motivacionais (50, 61). Motivação refere-se a uma complexidade de alterações humorais e neurais desencadeadas por uma particular necessidade do animal frente a um dado estímulo (50). Portanto, a motivação é uma função da interação entre ambiente externo e interno do animal, e consequentemente alterações nos níveis motivacionais podem ser obtidas através de variações nestes ambientes (50). A relação entre desempenho e motivação obedece

a uma curva em U invertido. Níveis motivacionais altos e baixos acarretam um fraco desempenho, enquanto que níveis médios de motivação um ótimo desempenho é observado (69, 92, 117). Este nível médio motivacional pode diferir de uma tarefa para outra (9, 92, 112). Portanto, quando o animal desnutrido apresenta um desempenho em uma dada tarefa diferente do animal normal, não é possível concluir se este efeito da desnutrição foi por interferência nos processos associativos ou nos não associativos (92).

No sentido de se obter informações acerca dos efeitos da desnutrição sobre o aprendizado, treinos que utilizam choques tem sido utilizados, porém sabe-se que ratos desnutridos apresentam um menor limiar ao choque nas patas (56, 110, 168). Este menor limiar ao choque pode desencadear um maior nível motivacional nos ratos desnutridos quando comparados com os ratos normais (92, 117). Dependendo do tipo de treino, esta diferença no nível motivacional pode acarretar, ou não, um melhor desempenho. Consequentemente, os dados na literatura sobre o desempenho de ratos em tarefas que utilizam choques como reforço negativo indicam que a desnutrição pode aumentar (109, 110, 111, 126), diminuir (106, 126,), ou mesmo não ter efeito sobre o aprendizado dos animais (65, 74, 106, 126).

A exposição de ratos ao campo aberto tem sido usada (um tipo de treino que não envolve reforço positivo nem negativo) no sentido de se avaliar o comportamento exploratório e/ou a emocionalidade dos animais ao ambiente novo (12, 186). As comparações comportamentais entre animais normais e desnutridos,

obtidas na exposição ao campo aberto, indicam que a desnutrição diminui o comportamento exploratório (57, 75, 200), aumenta (147, 167), ou não o afeta (57, 135, 166). Apesar da vantagem deste tipo de treino em não envolver reforço positivo nem negativo, o comportamento dos ratos em campo aberto sofre influência de uma série de fatores: genéticos (26), idade (53), manuseio durante a infância (108), tempo de exposição ao campo aberto, sexo, número de sessões de treino (24), etc.

DESNUTRIÇÃO E INCORPORAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM PROTEÍNAS CEREBRAIS.

Os trabalhos sobre os efeitos da desnutrição na incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais tem sido estudos ontogenéticos e "in vivo". Os maiores efeitos da desnutrição gestacional sobre a captação e incorporação de leucina em proteínas cerebrais são observados no dia do nascimento; os ratos desnutridos apresentam um aumento na captação e incorporação de leucina em proteínas cerebrais (176). Este efeito não é observado aos 21 dias de idade, mesmo com a continuidade da desnutrição durante o período lactacional (176). Ratos desnutridos durante a fase lactacional apresentam um aumento na captação cerebral de leucina e uma menor taxa de incorporação deste aminoácido em proteínas cerebrais, aos 14 dias de idade. Este efeito é abolido com o desenvolvimento, pois esta alteração não foi observada aos 32 dias de idade, mesmo naqueles animais não submetidos a reabilitação nutricional (155). No entanto, aos 2 meses de idade, dependendo da maneira como esta captação e incorporação de leucina em proteínas cerebrais e analisada, "in

vitro" ou "in vivo", os resultados são discordantes quanto a reversibilidade dos efeitos da desnutrição. Experimentos "in vitro" mostram que os ratos desnutridos apresentam uma incorporação de leucina em proteínas cerebrais igual a dos ratos normais (125), mas nos experimentos "in vivo" foi observada uma diminuição nesta incorporação mesmo nos ratos recuperados nutricionalmente (140). Estas alterações na captação e incorporação de leucina em proteínas não são devidas à alteração do "pool" endógeno de leucina, pois existem relatos de que a desnutrição não altera a concentração da leucina endógena (51, 125).

Por outro lado, sabe-se que ratos normais adultos submetidos a uma sessão comportamental apresentam um aumento na incorporação de aminoácidos em proteínas de diversas estruturas cerebrais (85, 149, 150, 171). Este aumento na incorporação de aminoácidos em proteínas é um fenômeno bifásico (121) e inespecífico ao sistema nervoso (85, 149, 150, 171). Esta alteração metabólica foi interpretada como sendo inespecífica com relação ao aprendizado, mas dependente das condições de estimulação nas quais se avalia o aprendizado. Esta alteração metabólica tende a diminuir com a exposição do animal à situação experimental através de vários dias consecutivos (149), estando mais relacionada com o estresse presente na situação experimental.

Alterações na incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais causadas por diferentes situações comportamentais, não tem sido investigadas em ratos desnutridos.

SISTEMA B-ENDORFINÉRGICO.

1. Geral.

A descoberta de receptores esteroespecíficos para a morfina e seus antagonistas (179) e sua posterior caracterização (143), levou muitos pesquisadores a procurar os ligantes endógenos para estes receptores.

No momento sabe-se da existência de 3 famílias distintas de opióides endógenos: encefalinas, B-endorfinas e dinorfinas. O precursor das encefalinas (met-encefalina, leu-encefalina, etc) é a pro-encefalina, isolada da medula adrenal e de vários sistemas neuronais (165). As maiores concentrações de encefalinas no rato são encontradas no globus palidus, striatum, hipotálamo, cérebro médio, núcleo central da amigdala, núcleos do tronco cerebral e gânglio dorsal da medula espinhal. A hipófise e o cerebelo são regiões do sistema nervoso de menor concentração de encefalinas (76, 152).

Pro-dinorfina é o precursor das dinorfinas (A, B, alfa e beta). Pro-dinorfina, como a pro-encefalina, é sintetizada em vários locais do sistema nervoso; hipófise, núcleos do hipotálamo, hipocampo, amigdala, áreas corticais, etc (98).

O precursor da B-endorfina é a pro-opiomelanocortina. A clivagem do precursor no sitio 40/41 origina pro-melanocortina e B-lipotrofina. A primeira origina ACTH (adrenocorticotrofina)e um fragmento de 16 Kdaltons, que por sua vez originam alfa- e gama-MSH (melanotrofina) e CLIP (peptídio tipo corticotrofina). A clivagem da B-lipotrofina origina Y-lipotrofina e B-endorfina(1-31) (98). A partir de B-endorfina-(1-31) são obtidas: a B-endorfina(1-27), B-endorfina(1-26), as formas N-acetiladas

destas 3 B-endorfinas (195, 196), alfa-endorfina e gama-endorfina (28). O processamento da pro-opiomelanocortina varia conforme a região cerebral ou da hipófise, pois a proporçaõ entre B-endorfina -(1-31), -(1-27), -(1-26) e as formas acetiladas destes 3 peptídios varia segundo a região analisada. Na hipófise anterior predomina a B-endorfina -(1-31), e na intermédia existe o predomínio das formas acetiladas e dos resíduos -(1-27) e -(1-26) (195). O hipotálamo, cérebro médio e amigdala contém principalmente B-endorfina -(1-31); mas o resíduo -(1-26) também é encontrado e o conteúdo de formas acetiladas é desprezível. Nas outras regiões cerebrais, hipocampo e tronco cerebral, as formas acetiladas e os resíduos -(1-27) e -(1-26) são predominantes (196). Em relaçaõ a clivagem da pro-melanocortina o hipotálamo contém principalmente alfa-MSH, enquanto o ACTH predomina na hipófise anterior (112).

Os corpos celulares dos neurônios B-endorfinérgicos estaõ no hipotálamo médio basal e projeta para os núcleos paraventriculares, periventriculares, ventro-medial e dorso-medial do hipotálamo, paraventricular do tálamo, amigdalóide medial, septum e núcleo próprio da estria terminalis, atingindo até o locus ceruleus. Um segundo grupo de células é encontrado em núcleos do trato solitarius (98). Os neurônios da hipófise que produzem B-endorfina são funcionalmente distintos dos hipotalâmicos, pois a hipofisectomia não altera os níveis cerebrais de B-endorfina (99).

Vários subtipos de receptores opióides tem sido identificados, de acordo com as constantes de afinidade por

determinados agonistas e antagonistas opióides. Os subtipos de receptores mais estudados são mu, Kappa e delta, em ordem decrescente de afinidade por naloxone (6, 131). Embora exista uma série de evidências farmacológicas e bioquímicas para os subtipos de receptores opióides, a relação entre estes receptores e os múltiplos sistemas opióides não esta bem esclarecida. Contudo, estudos "in vitro" tem mostrado que as encefalinas se ligam preferencialmente a receptor delta, dinorfina a receptores Kappa e B-endorfina a mu e delta, mas não a recetores Kappa (6, 131).

Os opióides agem como neuromoduladores na sinapse (33). Sabe-se que morfina, encefalinas e B-endorfina bloqueiam a liberação de catecolaminas (11, 114, 178) e acetilcolina no SNC, e de noradrenalina e acetilcolina no SNA (177), através de mecanismos pré-sinápticos (11). Atuam também por mecanismos pós-sinápticos, bloqueando a descarga induzida por glutamato e acetilcolina (198). Os opióides podem apresentar um efeito ativador nas células piramidais do hipocampo, provavelmente por inibição de neurônios inibitórios (199).

2. Fisiologia do sistema B-endorfinérgico.

Vários autores evidenciaram a participação dos sistemas opióides na modulação dos processos de memória em diferentes tipos de tarefas.

A administração pós-treino de B-endorfina, por via sistêmica (78, 81, 82) ou intra-cérebro-ventricular (116), prejudica a evocação de diversos tipos de tarefas, enquanto a administração pré-teste facilita a evocação (81, 82). Apesar da B-endorfina

ser um peptídio, sabe-se que 20% ou menos da dose administrada sistêmicamente alcança o cérebro dentro de 2 horas após a injeção (73, 148). A administração pós-treino de naloxone, um antagonista de receptor opióide, facilita a evocação (78, 123).

Por outro lado, diferentes formas de treino (esquiva ativa ou inibitória, habituação ao campo aberto, a simples exposição do animal a um ambiente novo) provocam uma diminuição na imunorreatividade tipo B-endorfina do hipotálamo de ratos adultos. Esta diminuição na imunorreatividade tem sido interpretada como liberação e posterior metabolização deste peptídio (84, 142). A possibilidade desta diminuição de imunorreatividade ser atribuída a uma redução de síntese deste peptídio pode ser descartada, pois esta diminuição é observada mesmo quando o animal é exposto por 30 segundos a caixa de condicionamento (142). A maioria dos treinos é seguida por um aumento de síntese proteica cerebral (149, 171). A síntese deste peptídio é um processo lento, e requer a síntese prévia de um precursor de elevada massa molecular, o qual deve ser processado até B-endorfina (112). Esta liberação de B-endorfina hipotalâmica não esta relacionada a nenhum aprendizado específico, grau de stress, ou dor, e sim à novidade da situação experimental, pois esta depleção é causada durante a simples exposição do animal à caixa de condicionamento e não é observada se o animal é exposto novamente a mesma situação experimental (84, 142). Já a depleção de B-endorfina hipofisária é dependente do grau de estresse da situação experimental (90).

A depleção de B-endorfina do hipotálamo ocasionada pela

experiência nova é abolida pela transecção do fornix, via neural que projeta do hipocampo para o hipotálamo (130). Como há evidências de que o sistema septo-hipocampal esteja envolvido com o reconhecimento da novidade, é possível que a liberação de B-endorfina do hipotálamo dependa do reconhecimento da novidade pelo sistema septo-hipocampal (64).

Relacionando os dados de administração pós-treino e pré-teste de B-endorfina, e liberação deste peptídio do hipotálamo, pode-se supor que os efeitos da B-endorfina sobre a evocação sejam devidos a uma dependência de estado endógena (79, 81).

Entende-se por dependência de estado endógena o fato de um animal ter uma boa evocação da tarefa na qual foi treinado, quando o contexto neurohumoral do treino e do teste forem semelhantes (136). Apesar da B-endorfina não ser liberada no teste, para esta diferença de contexto neurohumoral entre treino e teste existe uma evocação considerada normal. Portanto, se o animal for submetido a tratamentos que aumentem esta diferença de contexto neurohumoral entre treino e teste, a evocação da tarefa será prejudicada. Por outro lado, tratamentos que diminuem esta diferença facilitam a evocação. Seguindo este raciocínio, a administração pré-teste de B-endorfina facilita a evocação, pois procura igualar este contexto neurohumoral. Já a administração pós-treino de B-endorfina prejudica a evocação, pois aumenta a diferença do contexto neurohumoral entre treino e teste. Naloxone pós-treino facilita a evocação, pois tenta igualar esta diferença entre treino e teste, já que no dia do treino a B-endorfina liberada fica impedida de agir em seus receptores (79, 81).

Todas as formas de treino até o momento testadas mostraram

liberar B-endorfina do hipotálamo, indicando que, provavelmente, o efeito da B-endorfina pós-treino é dependente do somatório entre B-endorfina exógena e endógena. Uma questão que poderia ser levantada é se este somatório seria o único fator determinante para o efeito pós-treino da B-endorfina.

Diante de situação comportamental, há liberação central e periférica de catecolaminas (10, 49, 133), corticosteróides, ACTH, etc (49, 70, 122). A liberação destas substâncias pode depender da frequência ou da intensidade do estímulo apresentado na situação comportamental (70, 129). Além disso, esta liberação volta a ocorrer mesmo quando os animais são novamente expostos a tais situações, podendo variar ou não o grau de liberação (129). Portanto, a liberação destas outras substâncias não esta relacionada com a novidade, mas sim com outros parâmetros da situação comportamental. Logo, existe a possibilidade destas outras substâncias participarem do efeito da administração pós-treino de B-endorfina sobre a evocação (14, 83).

Numerosos estudos tem investigado a possível participação de peptídios opióides nos processos de analgesia ou antinocicepção. Estes estudos tem mostrado que a administração central ou periférica de peptídios opióides produz analgesia, e este efeito é bloqueado por antagonistas opióides (19, 63, 182). Uma outra abordagem desta questão é que a exposição de animais a situações comportamentais, envolvendo estímulos dolorosos (23) ou não (52, 86, 107), produzem analgesia que pode ser bloqueada por antagonista opióide (7, 23, 52, 86, 107). Isto indica um

componente opióide nos processos antinociceptivos. Devido à multiplicidade de sistemas opióides, fica difícil concluir qual ou quais destes sistemas estariam envolvidos nos processos antinociceptivos. No momento, o que se sabe é que diferentes estímulos estressantes provocam analgesia pela ativação de diferentes sistemas opióides (7), e não opióides (67).

Animais adultos submetidos a uma situação nova liberam B-endorfina do hipotálamo e apresentam uma resposta antinociceptiva, a qual é bloqueada por naloxone (163). Esta resposta antinociceptiva é de curta duração, sendo observada apenas quando são aplicados estímulos dolorosos de baixa intensidade (163). Até o momento, um dos candidatos para esta resposta antinociceptiva induzida pela novidade seria a B-endorfina hipotalâmica, pois os demais sistemas opióides parecem não ser ativados pela novidade (29). Além disso, uma segunda exposição a mesma situação não provoca resposta antinociceptiva (163), e nesta situação não se observa liberação de B-endorfina hipotalâmica (84).

3. Desenvolvimento do sistema B-endorfinérgico.

Imunorreatividade tipo B-endorfina tem sido detectada no cérebro de rato desde o estágio embrionário. Em determinadas estruturas como hipocampo, striatum (18) e medula espinhal (68) esta imunorreatividade diminui com o desenvolvimento, enquanto a hipófise apresenta um aumento (91, 181).

No hipotálamo, os níveis de imunorreativivdade tipo B-endorfina aumentam com o desenvolvimento, alcançando os níveis de

adulto ao redor da terceira a quarta semanas pós-natal (72). Alguns estudos mostram um aumento nestes níveis até 2 a 3 meses de idade (91).

As enzimas envolvidas no processamento do precursor (POMC) apresentam uma atividade diferencial com a idade e a região cerebral analisada. Na hipófise, as formas acetiladas da B-endorfina aumentam no lobo intermédio, enquanto que no lobo anterior ocorre uma diminuição com o desenvolvimento (158). O hipotálamo de ratos com 14 dias de vida apresenta somente B-endorfina (1-31), mas entre 20 e 45 dias existe uma aumento de um outro peptídio menor com imunorreatividade tipo B-endorfina (72).

Estudos sobre o desenvolvimento de receptores opióides mostram que a taxa de aparecimento destes sítios é maior entre a metade do estágio fetal até a terceira semana pós-natal, e um aumento mais gradual ocorre entre a terceira e a vigésima semanas de vida (13, 32). Um estudo comparativo sobre a ontogenia de sítios mu, delta e kappa mostra que existe um aparecimento diferencial destes sítios. Os receptores mu e kappa estão presentes em cérebro de ratos neonatos e os delta aparecem em fases posteriores do desenvolvimento (100). Além disso, os sítios mu sofrem uma redistribuição, com o desenvolvimento, em várias regiões cerebrais (100).

Em relação à funcionalidade de sistemas opióides, alguns trabalhos mostram que ratos neonatos apresentam uma resposta antinociceptiva quando submetidos à separação materna (95, 172). Provavelmente esta resposta antinociceptiva seja devida à ativação de sistemas opióides, pois é bloqueada por naloxone

(95, 172). No entanto, não fica especificado, nestes trabalhos, qual ou quais sistemas são ativados. Sabe-se que o sistema B-endorfinérgico hipofisário pode ser ativado a partir do terceiro dia de idade, pois ratos com esta idade submetidos a estresse com éter liberam B-endorfina da hipófise (77). Já a liberação de B-endorfina do hipotálamo parece se desenvolver nas primeiras 3 semanas pós-natal. Estudos "in vitro" mostram que a liberação (espontânea ou induzida por K+) de B-endorfina do hipotálamo de ratos e baixa aos 10 dias de vida. Contudo, aos 20 dias de idade esta liberação é maior do que aos 10 dias e não difere da observada aos 45 dias de idade (72). Apesar da capacidade do hipotálamo em liberar B-endorfina "in vitro", isto não significa que esta liberação ocorra "in vivo" naquelas situações em que ocorre no animal adulto. A liberação de B-endorfina do hipotálamo em ratos jovens, devida às situações comportamentais, não tem sido investigada.

OBJETIVOS

Os objetivos desta tese são:

a - Caracterizar o modelo de desnutrição desenvolvido nesta tese, quanto aos seguintes parâmetros: peso cerebral, peso corporal e conteúdo de DNA, RNA e proteínas em diferentes estruturas cerebrais.

b - Determinar a incorporação de leucina em proteínas de diferentes estruturas cerebrais, em ratos adultos desnutridos durante o aleitamento e submetidos a uma sessão de choques (estresse).

c - Determinar a imunorreatividade tipo B-endorfina em hipotálamo de ratos submetidos à desnutricao durante o aleitamento e submetidos a uma sessao de treino (novidade).

d - Verificar o efeito da administração pós-treino de B-endorfina em ratos desnutridos durante o aleitamento em diferentes situações comportamentais.

e - Determinar o efeito da exposição à novidade sobre a nocicepção em ratos desnutridos durante o aleitamento.

Todos estes itens (com exceção ao item b) foram realizados em ratos desnutridos, durante o aleitamento, com 21 dias e com 3 meses de idade, no sentido de verificar se possíveis efeitos encontrados nos ratos com 21 dias persistem até os 3 meses de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

1. METODO DE DESNUTRIÇÃO

Foram usados ratos Wistar provenientes do Biotério do Instituto de Biociências, UFRGS, de 60 a 90 dias de idade. Ratas alimentadas com dieta contendo 20g% de proteína desde o nascimento, eram acasaladas. Quando grávidas, eram colocadas em gaiolas indivíduais. No dia do nascimento de suas ninhadas, foram divididas em dois grupos: Grupo Normal - as mães continuavam a receber a dieta com 20g% de proteína e Grupo Desnutrido - as mães passavam a receber uma dieta com 8g% de proteína (tabela 1) durante o período de aleitamento. Dados na literatura mostram que a qualidade do leite das mães submetidas à desnutrição proteica pode ser alterada (39) ou não (128), mas todos concordam que ocorre uma diminuição na quantidade (39, 128). Como o número de filhotes permanece o mesmo (7 a 8) em ambos os grupos, a ninhada das mães desnutridas recebe menos leite durante a lactação, sendo submetidos , portanto, a uma desnutrição proteica e calórica. No dia do desmame, (vigésimo primeiro dia pós-natal) as ninhadas de ambos os grupos nutricionais foram separadas das mães e começavam a receber uma dieta com 20g% de proteína até 3 - 4 meses de idade (período de reabilitação nutricional). Dessa forma, o que diferencia o grupo normal do desnutrido na idade adulta, é o alimento disponível nos primeiros vinte e um dias de vida.

Nesta tese, ratos normais e desnutridos com 21 dias ou com

3-4 meses de idade foram utilizados nas análises neuroquímicas ou comportamentais.

TABELA 1

Composição das dietas (g/100g de dieta)

COMPONENTES	NORMAL	DESNUTRIDO
Proteína (Caseína) 1	20	8
Fibras	1	1
Mistura salina 2	4	4
Vitaminas 3	1	1
Óleo	15	15
L-metionina 4	0.15	0.15
Amido	58.85	70.85

1. B. Herzog.

2. Roche. Composição (mg/4g)

   $NaCl$ -557; KCl -3.2; KH_2PO_4 -1556; $MgSO_4$ -229; $CaCO_3$ -1526
   $FeSO_4.7H_2O$ -108; $MnSO_4.H_2O$ -16; $ZnSO_4.7H_2O$ -2.2;
   $CuSO_4.5H_2O$ -1.9; $CoCl_2.6H_2O$ -0.09

3. Roche. Composição (mg ou UI/g)

   Vitamina A - 2000 UI; Vitamina D - 200 UI; Vitamina E - 10 UI; Menadiona - 0.5; Colina - 200; ácido fólico - 0.2; ácido p - - amino benzóico - 1.0; inositol - 10; Ca-D-pantotenato - 4; riboflavina - 0.8; tiamina.HCl - 0.5; Piridoxina.HCl - 0.5; biotina - 0.04; Vitamina B - 0.003; amido para completar 1g.

2. e 3. Estão de acordo comos Métodos Oficiais de Análise da Associação de Química Analítica 1980.

4. Merck.

2. ANÁLISE COMPORTAMENTAL.

2.1 - SESSÃO DE FUGA AO CHOQUE - Foi realizada numa caixa de condicionamento automatizada, medindo 50 cm de comprimento, 25 cm de largura e 25 cm de altura, com paredes opacas, exceto a parede frontal que é transparente. O assoalho era constituído de barras de bronze de 2 mm de largura separadas por um espaço de 10 mm. O meio da caixa é marcado por uma barra de acrílico. As barras de cada metade são conectadas a um estimulador elétrico. Após 5 minutos de adaptação a caixa, o rato recebe choques 0.8 mA na metade da caixa onde se encontra, em intervalos randômicos de 10 a 50 segundos, até cruzar para a outra metade. O tempo que o rato leva para cruzar de um lado para o outro quando começa a receber o choque é registrado por um cronômetro instalado na caixa de condicionamento e é considerado como resposta de fuga ao choque. O rato recebe um total de 50 choques durante 25 minutos. Apesar de ter sido relatado o tempo de fuga dos 50 choques, na análise final foi utilizada somente a média dos 10 primeiros . Somente ratos normais e desnutridos de 3-4 meses de idade foram usados neste tipo de experimento.

2.2 - SESSÃO DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS - Foi realizada na mesma caixa descrita acima. Após o período de 5 minutos de adaptação a caixa, foram apresentados 50 tons (1.0 kHz, 70 dB) por 5 segundos em intervalos variáveis de 10 a 50 segundos. Cada tom era seguido de um choque nas patas, de 0.2 mA ou 0.8 mA, aplicado na metade da caixa em que o animal se encontrava, mantido até a emissão da resposta de cruzamento para a outra

metade da caixa. Os choques recebidos após os 10 primeiros tons foram cronometrados e considerados como resposta de fuga ao choque dentro da sessão de esquiva ativa. Para evitar o choque, os ratos aprendiam a emitir uma resposta de cruzamento ao ouvir o tom, o que era considerado resposta de esquiva. Quando isto ocorria, o choque que viria logo após ao tom era omitido. A apresentação dos estímulos (tons e choques), as respostas de esquiva e tempo de fuga ao choque eram registrados automáticamente. Os ratos foram submetidos a uma sessão de treino (primeiro dia) e, 24 horas após, a sessão de teste. A diferença teste - treino do número de respostas de esquiva foi utilizada como medida de memória (78).

2.3 - SESSÃO DE ESQUIVA INIBITÓRIA - Foi realizada numa caixa de condicionamento similar a acima descrita. Nesta caixa, parte do assoalho era coberto com uma plataforma de madeira com as seguintes dimensões: 12 cm de comprimento, 25 cm de largura e 5 cm de altura. O restante do assoalho era constituído por barras de bronze, com 1 mm de diâmetro, espaçadas 10 mm umas das outras. - Sessão de treino - Os animais eram gentilmente colocados de frente para o canto posterior esquerdo da caixa de condicionamento, sobre a plataforma. A latência até a descida completa do animal da plataforma para as barras de bronze (com as quatro patas na grade de bronze) foi cronometrada.

Imediatamente, os animais recebiam choques de 0.2 mA ou 0.8 mA, de forma intermitente, até subirem de volta para a plataforma.

- Sessão de teste - 24 horas após esta sessão de treino o animal era novamente colocado sobre a plataforma e a latência até descer da plataforma era cronometrado.

A diferença de latência teste - treino foi tomada com medida de memória. Um limite de 180 segundos foi estabelecido para esta diferença para os ratos adultos e 360 segundos para os ratos com 21 dias de idade. O fato dos ratos de 21 dias serem menores que os ratos de 3 meses, inicialmente pensava-se que nesta idade os ratos tivessem uma maior sensibilidade a uma dada intensidade de choque, comparado com os ratos adultos (138). Esta maior sensibilidade ao choque poderia acarretar uma maior latência de descida da plataforma (9, 138). Portanto, para os ratos de 21 dias de idade o tempo limite sobre a plataforma foi aumentado.
Observação - A altura da plataforma foi reduzida para 2.5 cm, quando ratos de 21 dias de idade foram treinados.

2.4 - SESSÃO DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO - Foi realizada numa caixa de madeira, medindo 50 cm de altura, 60 cm de largura e 40 cm de profundidade, com a face anterior de vidro. O assoalho era recoberto com linóleo e dividido em 12 retângulos de 15.0 X 13.3 cm com linhas brancas. Os animais eram colocados no canto esquerdo posterior da caixa e deixados livres para explorar o ambiente. Nesta sessão, o número de respostas de orientação ("rearing") foi relatado durante 2 minutos. Vinte quatro horas após a sessão de treino os animais foram submetidos a sessão de teste. A diferença treino - teste do número de respostas de orientação foi tomada como medida de memória (habituação) (38, 58). Como tem sido descrito diferenças sexuais neste tipo de

comportamento para os animais adultos, aos 3 meses somente machos adultos foram utilizados (24), mas aos 21 dias, ratos de ambos os sexos foram usados.

2.5 - CONTROLE NÃO TREINADO - Os animais eram retirados de suas caixa-moradia e decapitados para posterior análise neuroquímica. Logicamente, este grupo não era submetido a nenhum treino.

3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Logo após a sessão de treino em esquiva ativa de duas vias ou esquiva inibitória ou habituação ao campo aberto os animais eram injetados intraperitonealmente com salina (NaCl 0.9g%) 1,0 $ml.kg^{-1}$ de peso corporal ou com B -endorfina (1-31) 1 ou 2 $ug.kg^{-1}$ de peso corporal conforme o experimento. Estes animais eram submetidos a sessão de teste 24 horas após o treino.

4. MEDIDA DO REFLEXO DE RETIRADA DA CAUDA.

Foi realizada num aparelho de 'tail-flick' descrito por Siegfried e colaboradores (163). Os ratos eram contidos usando-se uma toalha de pano e colocados no aparelho com a cauda imobilizada sobre uma fenda delimitada por duas chapas de acrílico. Uma fonte luminosa fixa estava colocada 2,3 cm rostral a ponta da cauda do animal. O acionamento da fonte luminosa disparava automáticamente um cronômetro digital, e a deflexão da

cauda, motivada pelo calor irradiado da lâmpada, ativava uma fotocélula que desligava o cronômetro. A intensidade deste estímulo luminoso foi ajustado em 0,3 mA, para obter uma latência média de retirada da cauda (latência de Tail-flick - TFL) de 3 segundos. Para evitar danos na cauda do animal, foi imposto um limite de 10 segundos para a retirada da cauda.

O procedimento geral constou das etapas descritas a seguir. No dia 1 os animais foram familiarizados ao procedimento. A latência de base foi obtida para cada animal. A seguir, os ratos eram colocados isolados numa caixa de espera similar as caixas-moradias e colocados de volta nas respectivas caixas-moradias. No dia 2, os animais eram submetidos à medida de TFL 2 vezes: a primeira imediatamente antes e a segunda 2 minutos após a uma sessão de habituação ao campo aberto. Entre a sessão de habituação ao campo aberto e a segunda medida de TFL, os animais eram deixados na caixa de espera por 2 minutos. Os animais controle eram colocados individualmente por 2 minutos na caixa de espera entre as 2 medidas de TFL, sem exposição a qualquer situação experimental. A medida do reflexo de retirada da cauda foi utilizada como indicador de nocicepção (163).

5. DETERMINAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE $^{14}C_1$-LEUCINA EM PROTEÍNAS

O método utilizado para se medir a incorporação de $^{14}C_1$-leucina em proteínas foi adaptado a partir dos trabalhos de Dunlop et al. (48) e de Peterson e McKean (144). O procedimento de medida da radioatividade foi baseado nos trabalhos de Mans e Novelli (118).

Logo após a sessão de treino em fuga ao choque os animais eram decapitados, o cérebro retirado e colocado em gelo. A partir desta etapa, a experiência se processou entre 0 e 4 ^{o}C.

a - As estruturas cerebrais em estudo foram dissecadas: hipocampo, hipotálamo, caudato-putamen e resto de cérebro. Cerebelo, bulbos olfatórios e tronco cerebral não foram utilizados.

b - Os tecidos foram homogeneizados, em um volume 10 vezes maior do que o peso da estrutura (ml/g), numa solução que continha: NaCl -120 mM; KCl -4.8 mM; $MgSO_4$ -1.2 mM; tampão fosfato de sódio -15.5 mM, pH 7.4 e $CaCl_2$ -1.25 mM. A solução era pré-aquecida a 110 ^{o}C durante 1 hora, antes da adição de $MgSO_4$.

c - As estruturas foram homogeneizadas imediatamente antes da incubação, pois o homogeneizado perde 2% de sua capacidade biossintética em cada minuto (171). Uma aliquota (0.5 ml) do homogeneizado foi incubada a 37 ^{o}C, durante 60 minutos, na presença de 0.2 uCi de ^{14}C -leucina (New England Corporation; atividade específica: >300 mCi/mmol).

d - Para medir a incorporação inespecífica de ^{14}C -leucina (não dependente de processos de biossíntese proteica ^{1}), frações do homogeneizado foram incubadas a 0 ^{o}C também por 60 minutos.

e - A incubação foi interrompida com a adição de 0.25 ml do homogeneizado a 0.375 ml de agua destilada gelada e 0.625 ml de TCA 10 g%, contendo Leucina 1 mM.

f - 1.0 ml desta suspensão era filtrada em papel de filtro Whatman nº3, pré-umedecido com água destilada, sob ação de vácuo.

g - Os papéis de filtro (contendo as proteínas das estruturas) foram lavados 3 vezes com 250 ml de TCA 5g% a 0 ^{o}C (durante 60,

20 e 20 minutos).

h - Após a última lavagem com TCA, os papéis de filtro foram lavados 3 vezes com uma mistura etanol-éter etílico 1:1 (v/v). A primeira lavagem foi de 20 minutos a 37 °C e as duas últimas foram rápidas a temperatura ambiente.

i - As últimas lavagens foram feitas com 250 ml de éter etílico. A primeira por 20 minutos e as duas últimas, rápidas, todas a temperatura ambiente. Os papéis de filtro foram secados a temperatura ambiente.

j - Os papéis de filtro foram colocados num frasco com um líquido de cintilação com a seguinte composição: 4g de PPO e 50 mg de POPOP para cada litro de tolueno. A radioatividade foi medida num contador de cintilação líquida Beckman LS-100, durante 5 minutos com uma eficiência de 95%.

k - Da fração do homogeneizado incubado não precipitada com TCA 10g% retirou-se uma alíquota (50 ul) para medir a radioatividade total adicionada ao homogeneizado. Esta alíquota era colocada em papel de filtro e deixada secar a temperatura ambiente. A radioatividade deste papel foi medida como já descrito acima e representou a radioatividade no homogeneizado total.

l - Da fração do homogeneizado que não foi incubada, retirou-se uma alíquota para dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al. (115).

m - Os dados de incorporação de ^{14}C-leucina em proteínas são expressos como radioatividade relativa (RR) x 10^{-4}.

$$RR = \frac{(\text{cpm da amostra} - \text{cpm do controle a } 0\,^{o}C \times \text{mg de proteína})}{(\text{cpm do homogeneizado total})}$$

6. MEDIDA DA IMUNORREATIVIDADE TIPO B - ENDORFINA.

Os procedimentos de extração e radioimunoensaio para B - endorfina foram recomendados por Rossier et al. (152, 153) e Bloom et al. (21).

a - Os animais foram mortos por decapitação, o cérebro rapidamente retirado e colocado em gelo.

b - Região diencefálica, compreendendo hipotálamo mais parte ventral do tálamo (141, 142), foi dissecada sobre uma placa de petri invertida, colocada sobre gelo misturado com sal grosso. A medidada B - endorfina nesta região é referida nesta tese como B-endorfina hipotalâmica.

c - A estrutura dissecada foi pesada e colocadas em tubos de ensaio contendo ácido acético 1 N a 98 ^{o}C por 15 minutos.

d - Após resfriamento rápido, as estruturas foram homogeneizadas e submetidas a agitação constante por 3 horas a 4 ^{o}C.

f - Os tubos foram centrifugados a 3.000 x g por 20 minutos (centrifuga Sorvall) e o sobrenadante congelado para posterior dosagem da B-endorfina.

g - Os procedimentos de radioimunoensaio foram feitos de acordo com o protocolo do "Kit" para dosagem de B - endorfina da New England Nuclear.

Características do anticorpo do "Kit" para B -endorfina: O anticorpo usado neste Kit apresenta reatividade cruzada com pro-

opiomelanocortina , B-lipotrofina, B - endorfina (1-31), -(1-27), -(1-26) e as formas acetiladas das 3 B -endorfinas citadas (195, 196). Tem sido demonstrado que, em hipotálamo de rato adulto, a B-endorfina (1-31) representa 55% do total de imunorreatividade (195, 196). Desde que, para esta tese, não foi realizado qualquer procedimento de separação das formas citadas acima, os resultados obtidos serão referidos como imunorreatividade tipo B - endorfina.

7. DOSAGEM DE DNA, RNA E PROTEÍNAS.

A dosagem de DNA foi realizada segundo a técnica de Schneider (157), usando reação colorimétrica com difenilamina.

A dosagem de RNA foi realizada segundo a técnica de Fleck e Munro (55), espectrofotométricamente, a 260 nm.

A dosagem de proteína foi realizada segundo a técnica de Lowry et al. (115).

8. GRUPOS DE ESTUDO.

Para o melhor entendimento dos grupos de estudos, seria interessante especificar alguns aspectos gerais. Foram usados ratos de ambos os sexos, com 3-4 meses (adultos) ou 21 dias de idade.

-Normais ou 20g% de proteína com 21 dias: ninhadas de mães alimentadas com dieta 20g% de caseína durante o aleitamento.

-Desnutridos ou 8g% de proteína com 21 dias: ninhadas de mães alimentadas com dieta contendo 8g% de caseína durante o

aleitamento.

- Adultos normais ou 20g% de proteína : ratos que continuavam a receber uma dieta com 20g% de proteína após o desmame.

- Adultos desnutridos ou 8g% de proteína : ratos que durante o aleitamento mamavam em mães alimentadas com uma dieta contendo 8g% de caseína, passando a receber uma dieta contendo 20g% de proteína (período de reabilitação nutricional) após o desmame.

- controles não treinados: ratos normais ou desnutridos que não foram submetidos as tarefas comportamentais.

- treinados: ratos normais ou desnutridos que tenham sido submetidos a algum tipo de tarefa comportamental, especificada em cada experimento.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de incorporação de aminoácidos em proteínas e imunorreatividade à B-endorfina foram analisados por uma análise de variância para 2(dietas) x 2(controle/treinado) fatores (170) e as comparações posteriores pelo teste de raio múltiplo de Duncan (27).

As comparações entre duas médias dos grupos nutricionais foram analisadas pelo teste t de Student (27): pesos de cérebros, peso corporal, estruturas cerebrais, concentração de DNA, RNA e proteína, e latência de fuga ao choque. Para pesos cerebrais ou corporais aos 3 meses foi feita uma análise de variância para 2(dietas) x 2(sexos) fatores (170), seguida pelo teste do raio múltiplo de Duncan (27).

Os dados de esquiva ativa de duas vias, esquiva inibitória e habituação ao campo aberto foram analisados por uma análise de variância para 2(dietas) x 2(sessões) x 2(drogas) fatores (41). As comparações posteriores entre médias de treino e teste do mesmo animal foram feitas pelo teste F para efeito simples (27), e entre médias de animais de grupos diferentes pelo teste de raio múltiplo de Duncan (27).

Os dados de latência de retirada da cauda ("tail-flick") foram analisados por uma análise de variância para 2(dietas) x 2(controle/campo aberto) x 2(antes/após) fatores (41). As comparações posteriores entre as médias de antes e após do mesmo animal foram feitas pelo teste F para efeito simples (27).

Os dados de esquiva inibitória e 'tail-flick' por não apresentarem uma distribuição normal foram transformados (log x) antes de ser feita a análise de variância (170).

As análises para os ratos com 21 de idade foram feitas por ninhada (1), somente 1 ou 2 ratos foram usados de cada ninhada.

Em todos os experimentos, as análises posteriores só foram realizadas quando na análise de variância houve efeito significativo ($p < 0,05$). Os valores de F da análise de variância e da análise posterior, quando significantivos, serão relatados no texto e os níveis de significância das comparações posteriores serão relatados nas tabelas ou figuras.

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1 - CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO DE DESNUTRIÇÃO EM RATOS DE 21 DIAS E DE 3 MESES DE IDADE.

1. Peso corporal e cerebral.

Ratos desnutridos durante o aleitamento apresentaram um menor peso corporal, $t = 34,59$ $p < 0,001$ e cerebral, $t = 7,74$ $p < 0,001$ aos 21 dias de idade (dia do desmame), comparados com os ratos normais. A análise de variância dos pesos corporais aos 3 meses para 2(dietas) x 2(sexos) fatores indicou diferença significativa em relação a dieta [$F(1,73) = 100,98$; $p < 0,001$], em relação ao sexo [$F(1,73) = 552,22$; $p < 0,001$] e uma interação entre sexo e dieta [$F(1,73) = 14,53$; $p < 0,001$]. A análise de variância dos pesos cerebrais aos 3 meses para 2(dietas) x 2(sexos) fatores indicou diferença significativa em relação a dieta [$F(1,31) = 39,53$; $p < 0,001$] e uma interação entre dieta e sexo [$F(1,31) = 4,95$; $p < 0,05$]. Além disso, não houve diferença significativa entre os pesos cerebrais de machos e fêmeas em ambos os grupos nutricionais (Tabela 2). Portanto, o efeito da desnutrição durante o aleitamento sobre o peso corporal e cerebral não foi revertido pela reabilitação nutricional.

2. Conteúdo de DNA, RNA e proteínas em hipotálamo, hipocampo e caudato - putamen.

O peso de estruturas cerebrais, conteudo de DNA, RNA e proteínas nestas estruturas não foram alterados pela desnutrição durante o aleitamento, aos 21 dias e nem aos 3 meses de idade

(Tabela 3 e 4).

TABELA 2 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE O PESO CORPORAL E CEREBRAL DE RATOS COM 21 DIAS E 3 MESES DE IDADE. (a).

	Normais	desnutridos
peso corporal (g)		
21 dias	42,4 ± 7,3 (179)	19,0 ± 4,5 (156)*
3 meses -machos	286,0 ± 19,0 (16)	240,0 ± 14,0 (22)**
-fêmeas	194,0 ± 11,0 (17) #	174,2 ± 6,0 (19)**#
peso cerebral (mg)		
21 dias	935,0 ± 38,0 (23)	839,0 ± 46,0 (26)*
3 meses -machos	1069,6 ± 45,3 (8)	996,0 ± 54,2 (8)**
-fêmeas	1093,0 ± 44,6 (8)	942,0 ± 53,1 (8)**

a - Resultados em média ± DP (número de ratos)

* Teste t de Student: p < 0,001 em relação ao grupo normal.

Teste do raio múltiplo de Duncan:

** p < 0,01 em relação ao grupo normal.

# p < 0,01 em relação aos machos do respectivo grupo nutricional.

TABELA 3 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE PESO, CONTEÚDO DE DNA, RNA E PROTEÍNAS DE ESTRUTURAS CEREBRAIS EM RATOS COM 21 DIAS DE IDADE. (a)

	Normais	Desnutridos (e)
Hipotálamo		
peso (mg)	27,6 ± 5,7 (26)	25,0 ± 2,9 (27)
DNA (b)	21,6 ± 4,4 (8)	27,6 ± 9,6 (8)
RNA (c)	122,0 ± 27,0 (8)	138,0 ± 26,0 (8)
proteínas (d)	1,10 ± 0,27 (15)	1,04 ± 0,28 (15)
Hipocampo		
peso	65,3 ± 12,1 (23)	60,8 ± 13,8 (24)
DNA	71,7 ± 8,4 (8)	78,2 ± 18,2 (8)
RNA	396,0 ± 25,0 (7)	370,0 ± 83,0 (7)
proteínas	2,96 ± 0,36 (14)	3,51 ± 1,20 (16)
Caudato - putamen		
peso	70,2 ± 8,6 (22)	67,4 ± 6,0 (19)
DNA	58,2 ± 12,2 (7)	70,5 ± 13,8 (8)
RNA	346,0 ± 37,0 (7)	365,0 ± 74,0 (8)
proteínas	3,23 ± 0,33 (13)	3,48 ± 0,37 (15)

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ratos).

b,c - ug/estrutura

d - mg/estrutura

e - Teste t de Student: diferenças não significativas entre normal e desnutrido

TABELA 4 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE PESO, CONTEÚDO DE DNA, RNA E PROTEÍNAS DE ESTRUTURAS CEREBRAIS EM RATOS COM 3 MESES DE IDADE. (a)

	Normal	Desnutridos (e)
Hipotálamo		
peso (mg)	37,1 ± 6,1 (13)	38,0 ± 4,7 (9)
DNA (b)	46,2 ± 5,3 (8)	45,8 ± 3,3 (7)
RNA (c)	222,2 ± 11,1 (7)	240,1 ± 45,1 (7)
proteínas (d)	3,04 ± 0,46 (18)	3,36 ± 0,70 (16)
Hipocampo		
peso	88,4 ± 12,8 (14)	94,5 ± 5,9 (9)
DNA	69,3 ± 8,1 (6)	61,8 ± 6,6 (6)
RNA	386,0 ± 54,9 (8)	356,8 ± 79,7 (7)
proteínas	8,77 ± 1,78 (21)	8,35 ± 2,71 (16)
Caudato - putamen		
peso	77,1 ± 13,6 (10)	69,2 ± 4,61 (10)
DNA	123,8 ± 11,0 (7)	125,1 ± 14,2 (6)
RNA	359,0 ± 49,5 (8)	335,3 ± 31,9 (7)
proteínas	8,82 ± 1,65 (21)	9,00 ± 1,61 (14)

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ratos).

b,c - ug/estrutura

d - mg/estrutura

e - Teste t de Student: diferenças não significativas entre normal e desnutrido.

EXPERIMENTO 2 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE INCORPORAÇÃO DE $^{14}C_1$ - LEUCINA EM PROTEÍNAS DE ESTRUTURAS CEREBRAIS SUBMETIDOS À SESSÃO DE CHOQUES EM RATOS ADULTOS.

Na literatura tem sido postulado que ratos desnutridos apresentam uma maior reatividade ao choque elétrico (110, 168), o que poderia acarretar uma diferente resposta neuroquímica a situações que envolvem choques. Por outro lado, ratos adultos normais submetidos a uma situação estressante apresentam um aumento na incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais (149, 171). Neste experimento resolvemos investigar se os ratos desnutridos durante o aleitamento apresentam esta resposta neuroquímica quando submetidos a uma sessao de choques.

1 -Latência da resposta de fuga ao choque 0,8 mA.

Ratos normais e desnutridos durante o aleitamento foram submetidos a uma sessão de 50 choques nas patas com 0,8 mA de intensidade. Somente o tempo de fuga aos 10 primeiros choques foi relatado.

O resultado de latência de resposta de fuga ao choque com 0,8 mA é mostrado na tabela 5. A análise estatística revelou diferenças não significativas entre os ratos desnutridos e normais.

2 - Incorporação de $^{14}C_1$ -leucina em proteínas cerebrais.

Ratos normais e desnutridos foram submetidos a uma sessão com 50 choques, 0,8 mA de intensidade, e decapitados 4 horas após o treino. O grupo controle consistiu de ratos normais ou desnutridos que eram retirados da caixa-moradia e decapitados. A

escolha desta intensidade de choque foi devida ao fato desta alteração na incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais decorrente de uma sessão comportamental ser independente da intensidade de choques (171).

TABELA 5 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A LATÊNCIA DE RESPOSTA DE FUGA AO CHOQUE COM 0,8 mA DE RATOS ADULTOS.(a)

	Normais	Desnutridos
0,8 mA	1,37 ± 0,54 (35)	1,25 ± 0,41 (35)

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ratos).
Teste t de Student: ns.

Os resultados de incorporação de leucina em proteínas nas diferentes estruturas cerebrais são mostrados na Tabela 6. A análise de variância para 2(dietas) x 2(controle/treinado) fatores indicou que em hipotálamo houve uma interação significativa entre dieta e treino [F(1,45) = 11,4; p < 0,001]. Em caudato putamen houve um efeito significativo da dieta [F(1,42) = 25,7; p < 0,001] e do treino [F(1,42) = 11,9; p < 0,001]. As comparações posteriores indicaram que ratos normais submetidos a sessão de choques apresentaram um aumento na incorporação de ^{14}C-leucina em proteínas de hipotálamo e caudato - putamen, comparados com os normais não treinados. A desnutrição

durante o aleitamento aboliu este aumento na incorporação de ^{14}C - ^{1}leucina em proteínas das estruturas cerebrais, 4 horas após o treino, e em hipotálamo houve inclusive uma diminuição nesta incorporação. Além disso, houve uma diminuição na incorporação de ^{14}C -^{1}leucina em proteínas de caudato putamen em ratos desnutridos não treinados.

TABELA 6 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A INCORPORAÇÃO DE ^{14}C -^{1}LEUCINA EM PROTEÍNAS DE ESTRUTURAS CEREBRAIS EM RATOS ADULTOS, 4 HORAS APÓS UMA SESSÃO DE CHOQUES COM 0,8mA.(a)

	Normais		Desnutridos	
Estruturas	Controles	Treinados	Controles	Treinados
Hipotálamo	6,4 ± 1,2 (15)	7,9 ± 2,2*	7,0 ± 1,0 (11)	5,8 ± 1,2* (9)
Hipocampo	7,8 ± 1,1 (13)	8,7 ± 1,9 (14)	7,9 ± 1,6 (11)	7,1 ± 0,6 (8)
Caudato putamen	10,0 ± 1,5 (14)	11,9 ± 1,4**	8,6 ± 0,9" (9)	9,2 ± 1,3 (10)
Resto de cerébro	9,2 ± 2,6 (14)	10,2 ± 2,6 (14)	8,9 ± 1,6 (10)	8,8 ± 2,6 (11)

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ratos), de radioatividade relativa x 10^{-4}.

Teste de raio múltiplo de Duncan:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ em relação a seu grupo controle.

" $p < 0,001$ em relação ao grupo controle normal.

EXPERIMENTO 3 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A MEDIDA DA IMUNORREATIVIDADE TIPO B-ENDORFINA EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A DIFERENTES TIPOS DE TREINO.

Ratos adultos normais apresentam uma diminuição de B-endorfina do hipotálamo quando submetidos a diferentes situações experimentais, interpretada como liberação de B-endorfina (84, 142). Neste experimento resolvemos investigar se ratos desnutridos durante o aleitamento apresentam esta liberação de B-endorfina do hipotálamo quando treinados.

Ratos normais e desnutridos foram submetidos à esquiva inibitória com 0,2 mA de intensidade ou a uma sessão de 50 choques nas patas com 0,8 mA de intensidade. O grupo controle (nível basal) consistiu de ratos normais e desnutridos não treinados. Os ratos eram retirados da caixa-moradia e decapitados (grupo não treinado) ou treinados e logo após decapitados.

Os resultados da imunorreatividade tipo B-endorfina na esquiva inibitória são mostrados na Tabela 7 e da sessão de choque na Tabela 8. Na esquiva inibitória a análise de variância para 2(dietas) x 2(controle/treinado) fatores revelou diferenças significativas em relação a dieta [$F(1,36) = 11,97$; $p < 0,001$]. Na sessão de choques a análise de variância para 2(dietas) x 2(controle/treinado) fatores indicou diferenças significativas em relação a dieta [$F(1,31) = 4,64$; $p < 0,05$]. Em ambas as situações as comparações posteriores indicaram que os ratos normais treinados apresentaram uma diminuição na imunorreatividade tipo B-endorfina, comparados com os ratos não

treinados. Os ratos desnutridos não apresentaram esta diminuição quando submetidos às sessões de treino. Além disso, os ratos desnutridos não treinados apresentaram um menor nível nesta imunorreatividade, comparados com os ratos normais não treinados. Estes resultados sugerem que a liberação de B-endorfina do hipotálamo observada nos ratos normais independe da quantidade e da intensidade de choques. A desnutrição durante o aleitamento provocou alterações irreversíveis no sistema B-endorfinérgico hipotalâmico, pois os ratos desnutridos adultos não apresentaram esta liberação de B-endorfina quando treinados e apresentaram um menor nível basal de B-endorfina do hipotálamo.

TABELA 7 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A IMUNORREATIVIDADE TIPO B-ENDORFINA DO HIPOTÁLAMO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À ESQUIVA INIBITÓRIA (0,2 mA). (a)

	Normais	Desnutridos
Controle	802 ± 85 (10)	534 ± 158 (10)**
Treinado	624 ± 187(10)*	544 ± 183 (10)**

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ratos) de ng/g de estrutura.

Teste do raio múltiplo de Duncan:

* p < 0,05; ** p < 0,001 em relação ao grupo controle normal.

TABELA 8 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A IMUNORREATIVIDADE TIPO B-ENDORFINA DO HIPOTÁLAMO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE CHOQUES (0,8 mA). (a)

	Normais	Desnutridos
Controle	857 ± 412 (10)	494 ± 235 (9) *
Treinado	493 ± 168 (7) *	486 ± 130 (9) **

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ratos) de ng/g de estrutura.

Teste do raio múltiplo de Duncan:

* p < 0,05; ** p < 0,001 em relação ao grupo controle normal.

EXPERIMENTO 4 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS ADULTOS, INJETADOS COM B - ENDORFINA LOGO APÓS O TREINO.

A administração pós-treino de baixas doses de B - endorfina a ratos adultos normais, por via sistêmica ou intra-cérebro-ventricular, prejudica a evocação da tarefa na qual o animal foi treinado (78, 116). Tendo em vista que a desnutrição durante o aleitamento provoca uma alteração no sistema B - endorfinérgico de ratos adultos, resolvemos investigar se a administração pós-treino de B - endorfina também prejudica a evocação nos ratos desnutridos.

Ratos adultos normais e desnutridos durante o aleitamento foram submetidos a um treino e logo após injetados intraperitonealmente com B - endorfina ou salina, e 24 horas após submetidos à sessão de teste. As condições experimentais foram as seguintes:

1- esquiva ativa de duas vias com choques de 0,2 ou 0,8 mA e administrados pós-treino com 2 $ug.Kg^{-1}$ de peso corporal de B-endorfina.

2- esquiva inibitória com choques de 0,2 ou 0,8 mA e administrados pós-treino com 1 $ug.Kg^{-1}$ de peso corporal de B-endorfina.

3- habituação ao campo aberto e administrados pós-treino com 2 $ug.Kg^{-1}$ de peso corporal de B-endorfina.

Observação - para melhor entendimento dos gráficos alguns termos devem ser esclarecidos: SAL - ratos injetados pós-treino com salina, BETA - ratos injetados pós-treino com B-endorfina, 20% - ratos normais e 8% ratos desnutridos durante o aleitamento.

1 - Esquiva ativa de duas vias.

a - Latência da resposta de fuga ao choque com 0,2 e 0,8 mA.

Os resultados são mostrados na Tabela 9. Ratos desnutridos treinados com choques 0,2 mA apresentaram uma latência de resposta de fuga ao choque, após os 10 primeiros tons, menor do que os ratos normais $t = 3,48$; $p < 0,001$. Com 0,8 mA não houve diferença significativa na latência de resposta de fuga ao choque entre os grupos nutricionais.

TABELA 9. EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A RESPOSTA DE FUGA AO CHOQUE EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS USANDO 0,2 OU 0,8 mA. (a)

	Normais	Desnutridos
0,2 mA	2,89 ± 1,29 (33)	1,86 ± 0,87 (27) *
0,8 mA #	1,69 ± 0,60 (37)	1,39 ± 0,40 (22)

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ratos).
* Teste t de Student: $p < 0,001$ em relação ao grupo normal 0,2 mA; # diferença não significativa entre normal e desnutrido.

b - Respostas de esquiva com choques de 0,2 mA.

Os resultados de respostas de esquiva, usando choques de 0,2 mA, são mostrados na Figura 1. A análise de variância para 2(dietas) x 2(drogas) x 2(sessões) fatores indicou diferenças

significativas entre as sessões de treino e teste [F(1,84) = 140,44; p < 0,001]. As comparações posteriores indicaram que todos os grupos aumentaram o número de respostas de esquiva na sessão de teste, comparado com a sessão de treino: normal/salina [F(1,84) = 39,67; p < 0,001], normal/B-endorfina [F(1,84) = 18,18; p < 0,001], desnutrido/salina [F (1,84) = 42,15; p < 0,001] e desnutrido/B-endorfina [F(1,84) = 40,91; p < 0,001]. Portanto, com esta intensidade de choque, nem a desnutrição nem a administração pós-treino de B-endorfina tiveram efeito sobre as respostas de esquiva.

c - Respostas de esquiva com choques de 0,8 mA.

Os resultados de respostas de esquiva, usando choques de 0,8 mA, são mostrados na Figura 2. A análise de variância para 2(dietas) x 2(drogas) x 2(sessões) fatores indicou diferenças significativas entre treino e teste [F(1,80) = 104,54; p < 0,001] e uma interação significativa entre 2(dietas) x 2(drogas) x 2(sessões) [F(1,80) = 8,88; p < 0,005]. As comparações posteriores indicaram que todos os grupos aumentaram o número de respostas de esquiva na sessão de teste, comparado com a sessão de treino: normal/salina [F(1,80) = 68,28; p < 0,001], normal/B-endorfina [F(1,80) = 5,39; p < 0,025], desnutrido/ salina [F(1,80) = 24,3; p < 0,001] e desnutrido/B-endorfina [F(1,80) = 48,62; p < 0,001]. No entanto, ratos normais injetados pós-treino com B -endorfina apresentaram um menor número de respostas de esquiva no teste, quando comparados com os outros grupos, p < 0.01. Portanto, nesta intensidade de choque, a administração de B-endorfina pós-treino prejudicou a evocação de

respostas de esquiva somente em ratos normais e não foi observado efeito da dieta em ratos injetados com salina.

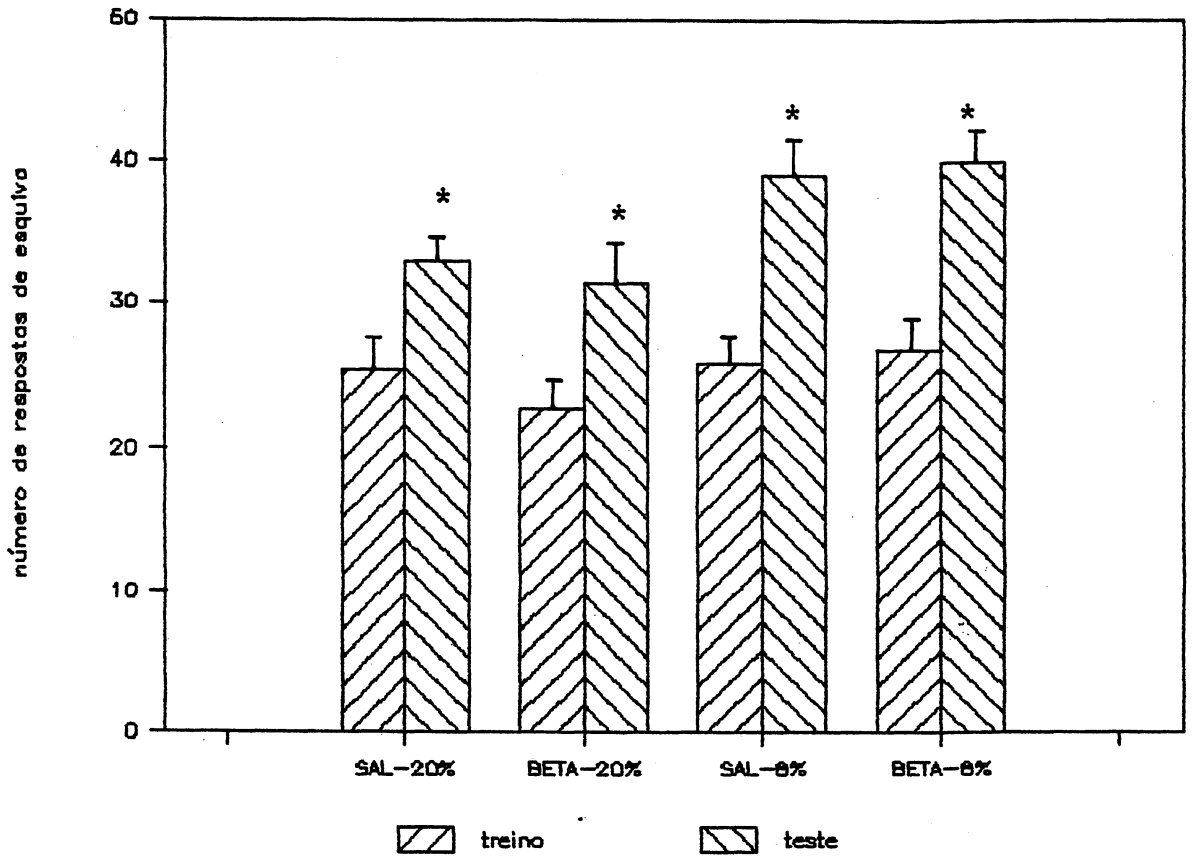

FIGURA 1. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de esquiva em ratos adultos submetidos à esquiva ativa de duas vias usando 0,2 mA. Resultados expressos em média ± DP. O número de ratos em cada grupo foi 22.
Teste F para efeito simples: * $p < 0,001$.

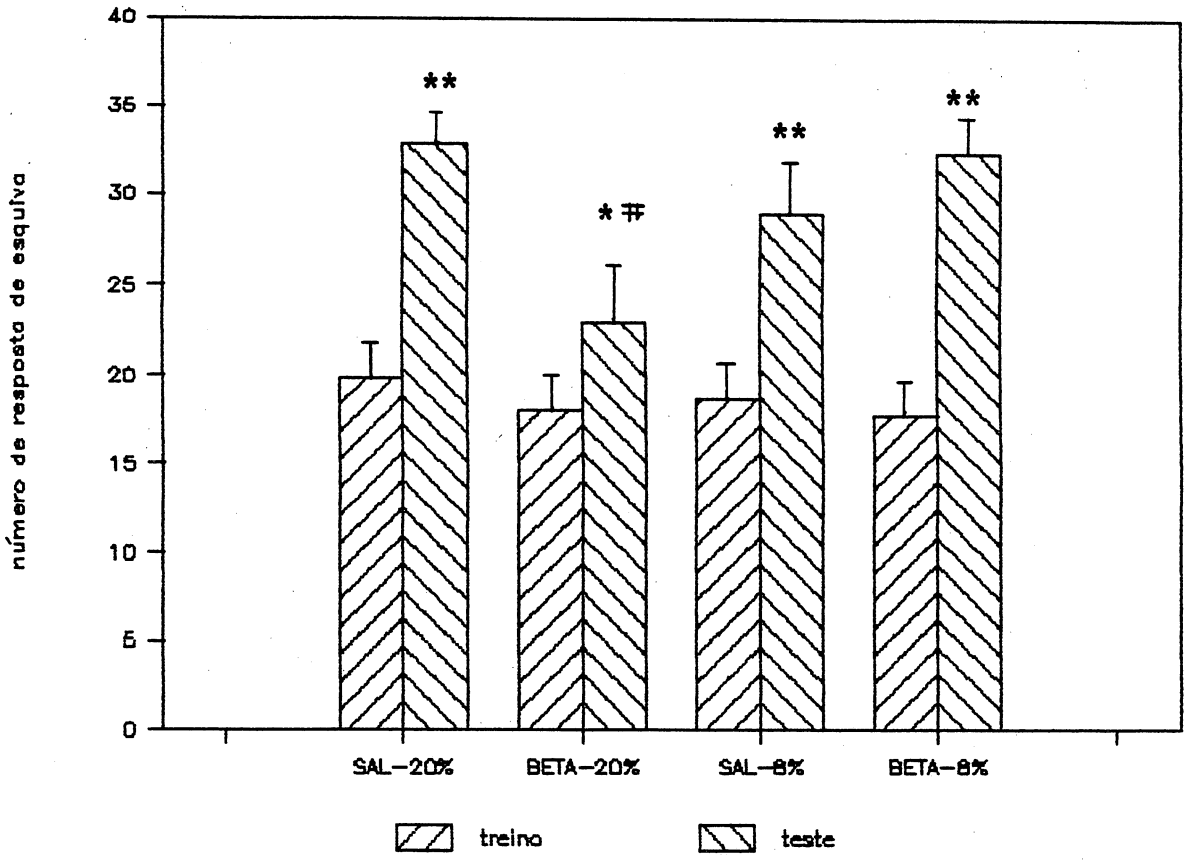

FIGURA 2. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de esquiva em ratos adultos submetidos à esquiva ativa de duas vias usando 0,8 mA. Resultados expressos em média ± DP. O número de ratos em cada grupo foi 21.

Teste F para efeito simples: * $p < 0,025$, ** $p < 0,001$.

Teste do raio múltiplo de Duncan: # $p < 0,01$ em relação ao teste dos outros grupos.

2 - Esquiva inibitória.

a - Latência de descida da plataforma com choques de 0,2 mA.

Os resultados de latência em esquiva inibitória usando choques de 0,2 mA são mostrados na Figura 3. A análise de variância para 2(dietas) x 2(drogas) x 2(sessões) fatores indicou diferenças significativas entre as latências do treino e do teste [$F(1,76) = 269,81$; $p < 0,001$] e uma interação significante entre 2(dietas) x 2(drogas) x 2(sessões) [$F(1,76) = 15,4$; $p < 0,001$]. As comparações posteriores indicaram que todos os grupos aumentaram a latência de descida da plataforma no dia do teste, comparados com o dia do treino: normal/salina [$F(1,76) = 61,12$; $p < 0,001$], desnutrido/B-endorfina [$F(1,76) = 29,91$, $p < 0,001$], desnutrido/salina [$F(1,76) = 118,93$, $p < 0,001$] e desnutrido/B-endorfina [$F(1,76) = 82,09$, $p < 0,001$]. No entanto, ratos normais que receberam B-endorfina pós-treino apresentaram uma menor latência no dia do teste, quando comparados com os outros grupos, $p < 0,01$. Portanto, a administração pós-treino de B-endorfina somente prejudicou a evocação nos ratos normais, e não foi observado efeito da dieta nos ratos injetados com salina.

b - Latência de descida da plataforma com choques de 0,8 mA.

Os resultados de latência em esquiva passiva usando choques de 0,8 mA são mostrados na Figura 4. A análise de variância para 2(dietas) x 2(drogas) x 2(sessões) fatores indicou diferenças significativas entre treino e teste [$F(1,76) = 458,55$, $p < 0,001$]. As comparações posteriores indicaram que todos os grupos

aumentaram a latência de descida da plataforma no dia do teste, comparados com o dia do treino: normal/salina [$F(1,76) = 117,26$; $p < 0,001$], normal/B-endorfina [$F(1,76) = 111,88$, $p < 0,001$], desnutrido/salina [$F(1,76) = 127,44$; $p < 0,001$] e desnutrido/B-endorfina [$F(1,76) = 100,88$; $p < 0,001$]. Portanto, nesta intensidade de choque, nem a desnutrição nem a administração pós-treino de B-endorfina tiveram efeito sobre o comportamento dos ratos nesta tarefa.

c - Aumento na intensidade de choque sobre as respostas de esquiva e na latência de descida da plataforma.

Os resultados das respostas de esquiva na esquiva ativa de duas vias e latência de descida da plataforma na esquiva inibitória são mostrados na Tabela 10. O aumento na intensidade de choque de 0,2 para 0,8 mA causou uma diminuição nas respostas de esquiva $t = 4,7$; $p < 0,005$. No entanto, na esquiva inibitória este aumento na intensidade de choque provocou um aumento na latência de descida da plataforma $t = 2,86$; $p < 0,01$.

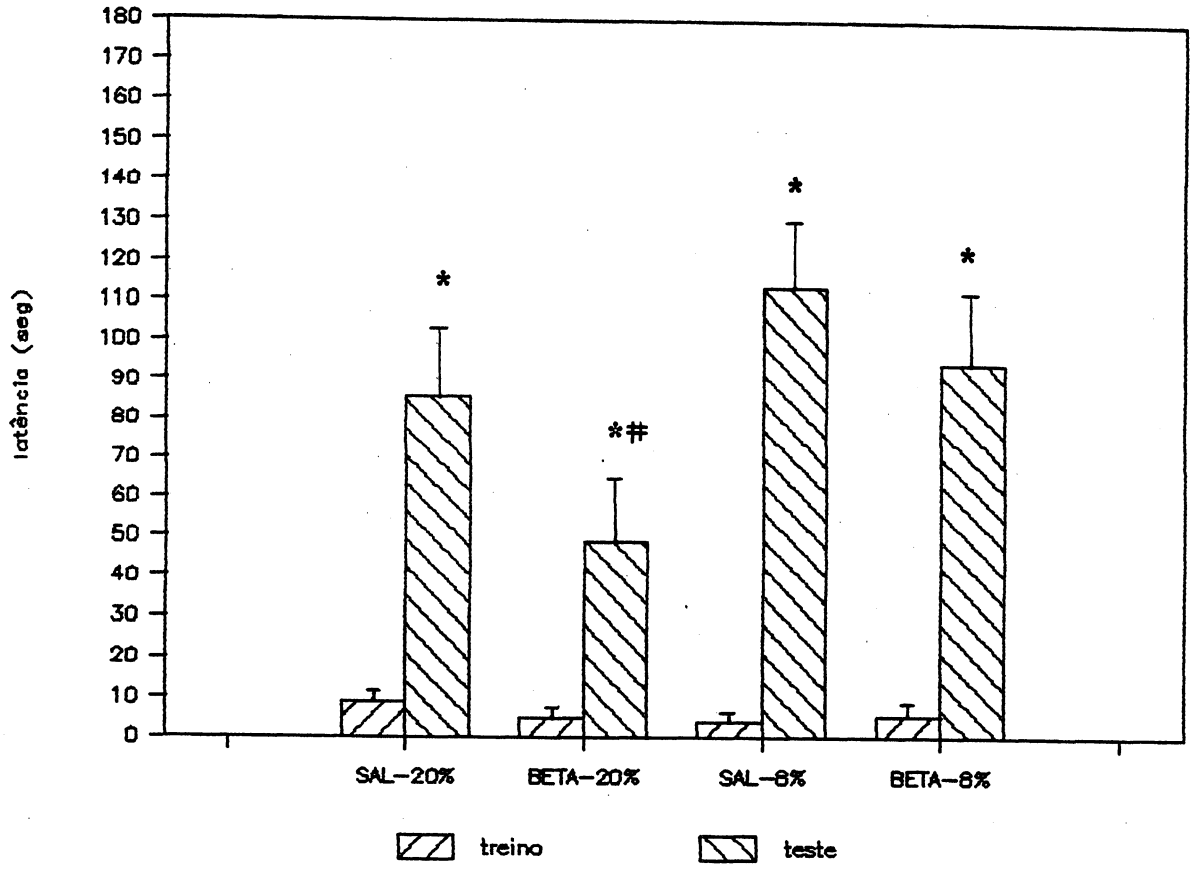

FIGURA 3. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre a latência de descida da plataforma em ratos adultos submetidos à esquiva inibitória usando 0,2 mA. Resultados expressos em média ± EP. O número de ratos em cada grupo foi 20.

Teste F para efeito simples: * $p < 0,001$.

Teste do raio múltiplo de Duncan: # $p < 0,01$ em relação ao teste dos outros grupos.

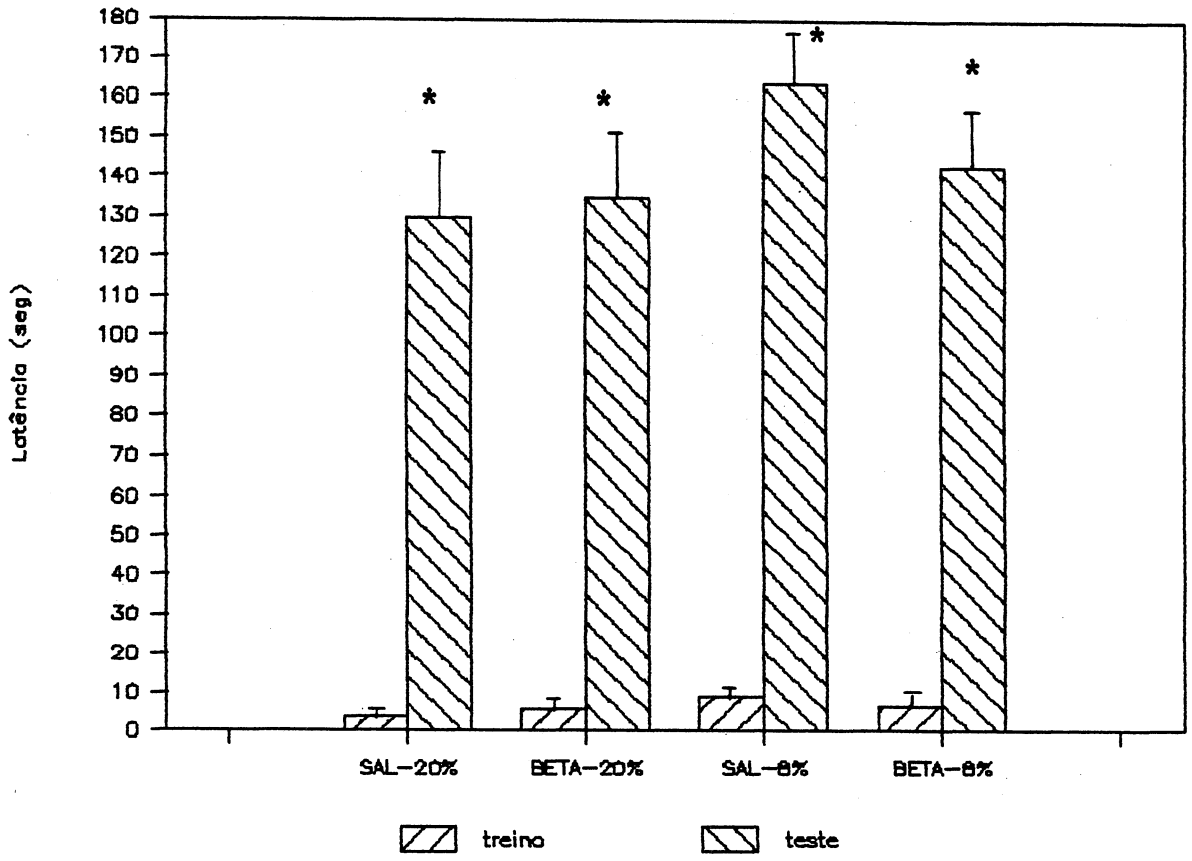

FIGURA 4. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre a latência de descida da plataforma em ratos adultos submetidos à esquiva inibitória usando 0,8 mA. Resultados expressos em média ± EP. O número de ratos em cada grupo foi 20.

Teste F para efeito simples: * $p < 0,001$.

TABELA 10 - EFEITO DA INTENSIDADE DE CHOQUE NA ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS (EA) E NA ESQUIVA INIBITÓRIA (EI) EM RATOS ADULTOS. (a)

	E.A.	E.I.
0,2 mA	25,2 ± 9,42 (88)	99,5 ± 76,35 (40)
0,8 mA	18,65 ± 8,5 ** (84)	146,9 ± 67,8 * (40)

a - Resultados expressos em media ± DP (numero de ratos).

E.A - número de respostas de esquiva.

E.I - latência de descida da plataforma (segundos).

Teste t de Student - * p < 0,01 ; ** p < 0,005 do respectivo treino 0,2 mA.

3 - Habituação ao campo aberto.

Os resultados das respostas de orientação são mostrados na Figura 5. A análise de variância para 2(dietas) x 2(drogas) x 2(sessões) fatores indicou diferenças significativas em relacao à dieta [$F(1,68) = 4,44$; $p < 0,05$], entre as sessões de treino e teste [$F(1,68) = 53,77$; $p < 0,001$] e uma interação significativa entre 2(dietas) x 2(drogas) [$F(1,68) = 4,06$; $p < 0,05$]. As comparações posteriores indicaram que somente o grupo normal injetado pós-treino com B-endorfina não apresentou diferenças entre treino e teste nas respostas de orientação. Os demais grupos apresentaram uma diminuição significativa destas respostas na sessão de teste, quando comparados com a sessão de treino: normal/salina [$F(1,68) = 22,55$; $p < 0,001$], desnutrido/salina [$F(1,68) = 21,07$; $p < 0,001$] e desnutrido/B-endorfina [$F(1,68) = 13,04$; $p < 0,001$]. Portanto, a administração de B-endorfina pós-treino prejudicou a evocação das respostas de orientação somente nos ratos normais (não se habituaram) e não houve diferenças nas respostas de orientação entre os ratos normais e desnutridos injetados com salina.

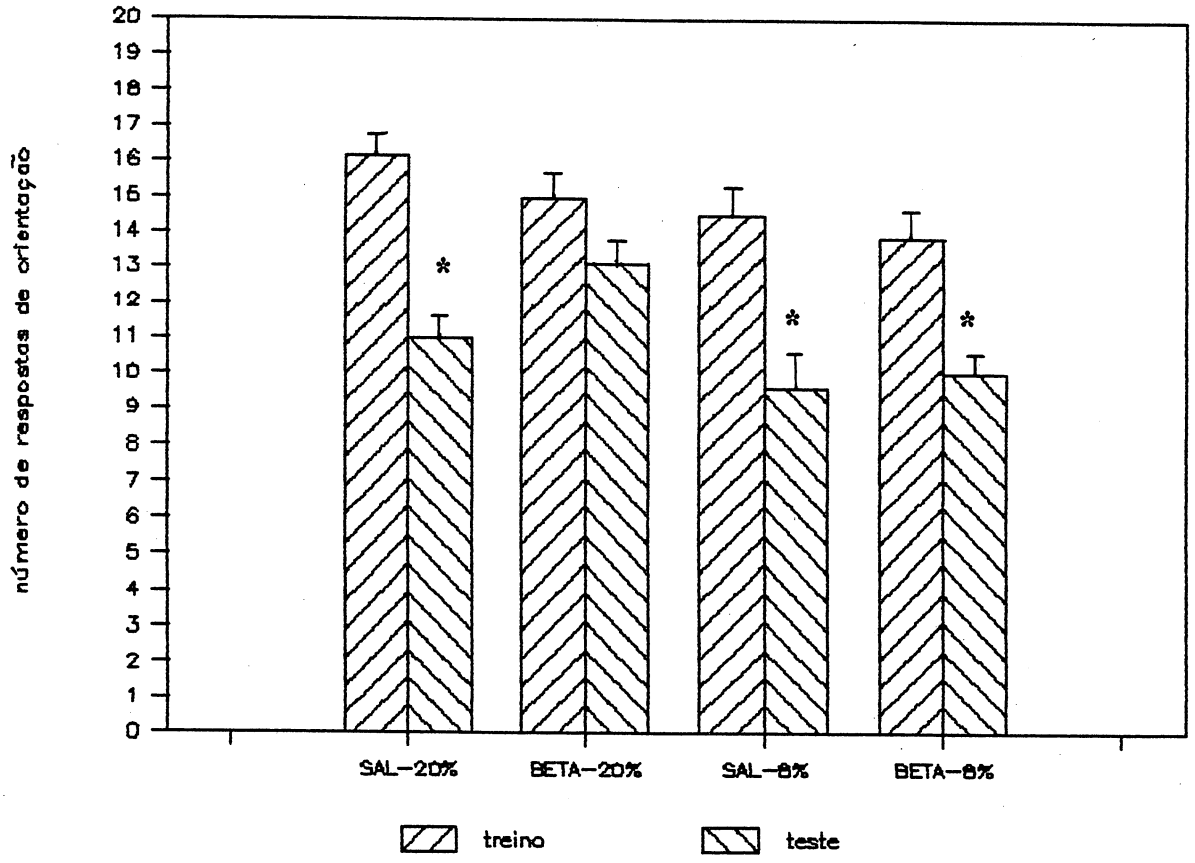

FIGURA 5. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de orientação em ratos adultos submetidos ao campo aberto. Resultados expressos em média ± DP. O número de ratos em cada grupo foi 18.

Teste F para efeito simples: * $p < 0,001$.

EXPERIMENTO 5 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE NOCICEPÇÃO EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO.

Sabe - se que, ratos adultos normais submetidos a um treino liberam B - endorfina do hipotálamo, e esta liberação tem sido interpretada como sendo devida, provavelmente, à novidade de uma sessão experimental. Por outro lado, uma sessão de treino provoca em ratos adultos normais uma resposta antinociceptiva, a qual é revertida por naloxone, sugerindo um mecanismo opióide (163). Desde que a desnutrição abole a resposta de liberação de B - endorfina do hipotálamo, resolvemos investigar se esta resposta antinociceptiva induzida pelo treino ocorre nos ratos desnutridos.

Ratos adultos normais e desnutridos durante o aleitamento foram submetidos a uma sessão de habituação ao campo aberto. Dois minutos antes e 2 minutos após esta sessão, os animais foram submetidos a medida da latência do reflexo de retirada da cauda de um estímulo doloroso (calor). Os grupos controle consistiam de ratos normais e desnutridos que ao invés de serem submetidos ao campo aberto, ficavam na sua caixa-moradia.

Os resultados são mostrados na Tabela 11. A análise de variância para 2(dietas) x 2(controle/campo aberto) x 2(antes/após) fatores indicou interação entre a exposição ao campo aberto e as medidas antes/após [F(1,48) = 7,11; p < 0,05]. As comparações posteriores indicaram que somente os ratos normais submetidos à sessão de habituação ao campo aberto apresentaram diferença significativa entre as duas medidas de latência do reflexo de retirada da cauda: [F(1,48) = 10,43; p < 0,005].

Portanto, a exposição ao campo aberto induziu uma resposta antinociceptiva nos ratos normais adultos e este efeito não foi observado nos ratos adultos desnutridos.

TABELA 11 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A RESPOSTA "ANTINOCICEPTIVA" INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AO CAMPO ABERTO EM RATOS ADULTOS. (a)

	Normais		Desnutridos	
	Antes	Após	Antes	Após
Controle	5,1 ± 1,0 (13)	4,8 ± 1,1 (13)	4,8 ± 0,9 (13)	4,5 ± 1,2 (13)
Campo aberto	4,5 ± 1,1 (13)	7,0 ± 4,0* (13)	5,1 ± 0,7 (13)	5,4 ± 1,8 (13)

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ratos) da latência do reflexo de retirada da cauda em segundos.
Teste F para efeito simples: * p < 0,005 em relação à latência antes da exposição ao campo aberto.

Antes - medida da latência do reflexo de retirada da cauda antes dos ratos terem sido submetidos à caixa de espera (controle) ou à novidade (campo aberto).
Após - medida da latência do reflexo de retirada da cauda após os ratos terem sido submetidos à caixa de espera (controle) ou à novidade (campo aberto)

EXPERIMENTO 6 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A IMUNORREATIVIDADE TIPO B-ENDORFINA NO HIPOTÁLAMO DE RATOS COM 21 DIAS DE IDADE SUBMETIDOS A DIFERENTES TIPOS DE TREINOS.

Em experimento anterior observamos que ratos adultos normais apresentam diminuição na imunorreatividade tipo B-endorfina hipotalâmica quando submetidos a diferentes tipos de treino e ratos desnutridos adultos não apresentam esta resposta. Além disso, os ratos desnutridos adultos apresentam um menor nível basal de B-endorfina hipotalâmica, comparados com os ratos normais. Neste experimento resolvemos investigar se estes efeitos observados nos ratos adultos já estão presentes nos ratos com 21 dias de idade.

Como até o momento não existe na literatura estudos sobre liberação de B-endorfina hipotalâmica em ratos normais jovens submetidos a sessões comportamentais, resolvemos utilizar dois tipos de treinos: um que envolve choques (esquiva inibitória) e outro que não envolve choques (habituação ao campo aberto). Ratos normais e desnutridos com 21 dias de idade foram treinados em esquiva inibitória (0,2 mA) ou habituação ao campo aberto. Os grupos controle consistiam de ratos normais ou desnutridos não treinados. Os ratos eram retirados da caixa-moradia e decapitados (grupo não treinado) ou treinados e logo após decapitados.

Os resultados estão mostrados na Tabela 12 e 13. A análise de variância para 2(dietas) x 2(controle/treinado) fatores revelou diferenças não significativas em relação a dieta e entre controle e treinado.

TABELA 12 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A IMUNORREATIVIDADE TIPO B-ENDORFINA NO HIPOTÁLAMO DE RATOS COM 21 DIAS DE IDADE SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE ESQUIVA INIBITÓRIA. (a)

	Normais	Desnutridos
Controle	855 ± 119 (6)	837 ± 111 (6)
Treinado	853 ± 138 (6)	812 ± 92 (6)

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ninhadas) de ng/g de estrutura. Análise estatística revelou diferenças não significativas.

TABELA 13 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A IMUNORREATIVIDADE TIPO B-ENDORFINA NO HIPOTÁLAMO DE RATOS COM 21 DIAS DE IDADE SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO. (a)

	Normais	Desnutridos
Controle	876 ± 121 (5)	860 ± 108 (5)
Treinado	860 ± 152 (5)	865 ± 177 (5)

a - Resultados expressos em média + DP (número de ninhadas) de ng/g de estrutura. A análise estatística revelou diferenças não significativas.

EXPERIMENTO 7 - EFEITO DA SEPARAÇÃO DA MÃE SOBRE A IMUNORREATIVIDADE TIPO B-ENDORFINA NO HIPOTÁLAMO DE RATOS NORMAIS E DESNUTRIDOS COM 21 DIAS DE IDADE.

No experimento anterior vimos que o treino não provocou uma diminuição na imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo de ratos normais e desnutridos com 21 dias de idade. Esta diminuição, que normalmente ocorre em ratos adultos normais, tem sido interpretada como liberação de B-endorfina devido à novidade do treino. Os ratos com 21 dias de idade 5 minutos antes de serem submetidos ao treino eram separados da mãe, a qual poderia ser vista como uma novidade para os ratos jovens. Portanto, os animais não diminuiriam a imunorreatividade tipo B-endorfina com o treino, pois esta já estaria diminuida devido à separação materna. Neste experimento resolvemos investigar a possibilidade da separação materna (desmame) alterar a imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo de ratos normais e desnutridos com 21 dias de idade.

A imunorreatividade de ratos normais e desnutridos com 21 dias de idade separados da mãe (desmame) foi comparada com aquela de ratos que não foram separados da mãe (controle).

Os resultados estão mostrados na Tabela 14. A análise de variância para 2(dietas) x 2(controle/desmame) fatores revelou diferenças não significativas em relação a dieta e entre controle e desmame.

TABELA 14 - EFEITO DA SEPARAÇÃO DA MÃE (DESMAME) SOBRE A IMUNORREATIVIDADE TIPO B-ENDORFINA NO HIPOTÁLAMO DE RATOS NORMAIS E DESNUTRIDOS COM 21 DIAS DE IDADE. (a)

	Normais	Desnutridos
Controle	737 ± 89 (6)	834 ± 89 (6)
Desmame	820 ± 127 (6)	765 ± 93 (6)

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ninhadas) de ng/g de estrutura. A análise estatística revelou diferenças não significativas.

EXPERIMENTO 8 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS COM 21 DIAS DE IDADE, INJETADOS COM B -ENDORFINA LOGO APÓS A DIFERENTES TIPOS DE TREINOS.

Em experimentos anteriores vimos que ratos normais adultos injetados pós -treino com B -endorfina apresentam um prejuízo da evocação da tarefa. Este efeito não foi observado nos ratos adultos desnutridos durante o aleitamento. Neste experimento, resolvemos investigar se estes efeitos observados em ratos adultos ja estão presentes em ratos com 21 dias de idade.

Ratos normais e desnutridos com 21 dias de idade foram submetidos a um treino e logo após injetados intraperitonealmente com B - endorfina ou salina. O teste foi realizado 24 horas após o treino. As condições experimentais foram as seguintes:

1 - esquiva ativa de duas vias com choques de 0,2 ou 0,8 mA e administrados pós-treino com 2 ug.Kg^{-1} de peso corporal de B-endorfina.

2 - esquiva inibitória com choques de 0,2 ou 0,8 mA e administrados pós-treino com 1 ou 2 ug.Kg^{-1} de peso corporal de B-endorfina.

3 - habituação ao campo aberto administrados pós-treino com 2 ug.Kg^{-1} de peso corporal de B-endorfina.

1 - Esquiva ativa de duas vias.

a - Latência da resposta de fuga ao choque com 0,2 e 0,8 mA.

Os resultados estão mostrados na Tabela 15. A análise

estatística revelou diferenças não significativas na latência de resposta de fuga ao choque entre ratos normais e desnutridos em 0,2 e 0,8 mA.

TABELA 15- EFEITO DA DESNUTRICAO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A LATENCIA DA RESPOSTA DE FUGA AO CHOQUE DE RATOS COM 21 DIAS SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS COM 0,2 OU 0,8 mA. (a)

	Normais	Desnutridos (b)
0,2 mA	2,43 ± 0,58 (12)	2,54 ± 1,28 (10)
0,8 mA	1,82 ± 0,72 (12)	1,48 ± 0,77 (10)

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ninhadas).
b - Teste t de Student: diferenças não significativas entre normal e desnutrido em 0,2 e 0,8 mA.

b - Respostas de esquiva com choques de 0,2 mA.

Os resultados das respostas de esquiva usando choques de 0,2 mA são mostrados na Figura 6. A análise de variância para 2(dietas) x 2(drogas) x 2(sessões) fatores indicou diferenças significativas em relação a dieta [$F(1,40) = 8,1$; $p < 0,001$] e entre as sessões de treino e teste [$F(1,40) = 48,3$; $p < 0,001$]. As comparações posteriores indicaram que todos os grupos aumentaram o número de respostas de esquiva na sessão de teste, comparado com a sessão de treino: normal/salina [$F(1,40) =$

17,25; p < 0,001], normal/B-endorfina [F(1,40) = 15,45; p < 0,001], desnutrido/salina [F(1,40) = 9,12; p < 0,005] e desnutrido/ B-endorfina [F(1,40) = 6,98; p < 0,025]. Como houve efeito da dieta, foi feita uma análise estatística pelo teste do raio múltiplo de Duncan do somatório das médias de respostas de esquiva de treino e teste, a qual indicou que os ratos desnutridos apresentaram um menor desempenho (salina, 47,0; B-endorfina, 43,2) que os ratos normais(salina, 56,1; B-endorfina, 54,8), p < 0,05. Portanto, com esta intensidade de choque, a administração pós-treino de B-endorfina não teve efeito sobre as respostas de esquiva e os ratos desnutridos apresentaram um menor desempenho nesta tarefa.

c - Respostas de esquiva com choques de 0,8 mA.

Os resultados de respostas de esquiva usando choques de 0,8 mA são mostrados na Figura 7. A análise de variância para 2(dietas) x 2(drogas) x 2(sessões) fatores indicou diferenças significativas em relação a dieta [F(1,44) = 13,5; p < 0,001] e entre as sessões de treino e teste [F(1,44) = 43,4; p < 0,001]. As comparações posteriores indicaram que todos os grupos aumentaram as respostas de esquiva na sessão de teste, quando comparados com a sessão de treino: normal/salina [F(1,44) = 11,83; p < 0,005], normal/B-endorfina [F(1,44) = 22,25; p < 0,001], desnutrido/salina [F(1,44) = 5,87; p < 0,05] e desnutrido/B-endorfina [F(1,44) = 6,69; p < 0,05]. Como houve efeito da dieta foi feita uma análise estatística pelo teste do raio múltiplo de Duncan do somatório das médias de respostas de esquiva do treino e teste, a qual indicou que os ratos

desnutridos apresentaram um menor desempenho (salina, 38,4; B-endorfina, 38,0) que os ratos normais (salina, 51,3; B-endorfina, 55,8), p < 0,001. Portanto, com esta intensidade de choque, a administração de B - endorfina pós-treino não teve efeito sobre as respostas de esquiva e os ratos desnutridos apresentaram um menor desempenho nesta tarefa.

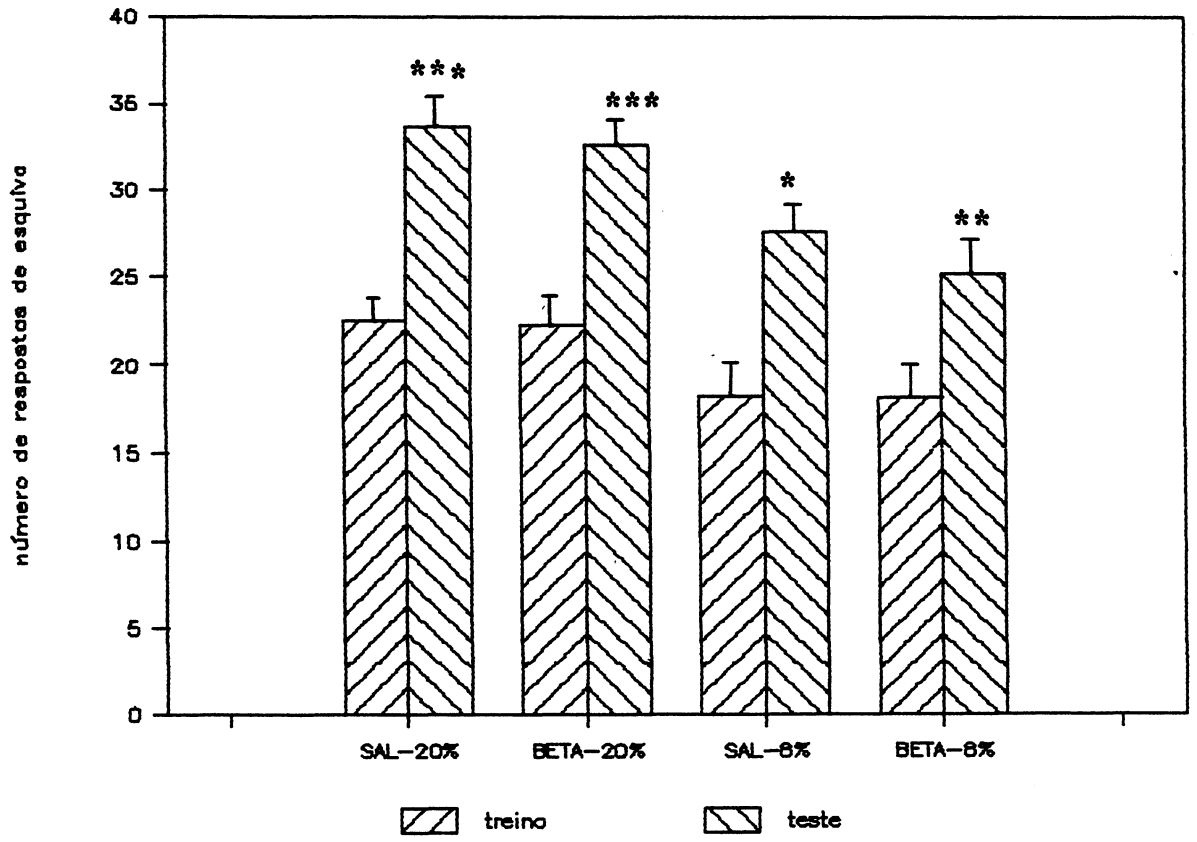

FIGURA 6. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de esquiva em ratos de 21 dias de idade submetidos à esquiva ativa de duas vias usando 0,2 mA. Resultados expressos em média ± DP. O número de ninhadas em cada grupo foi 11.
Teste F para efeito simples: * p < 0,05, ** p < 0,025, *** p < 0,001.

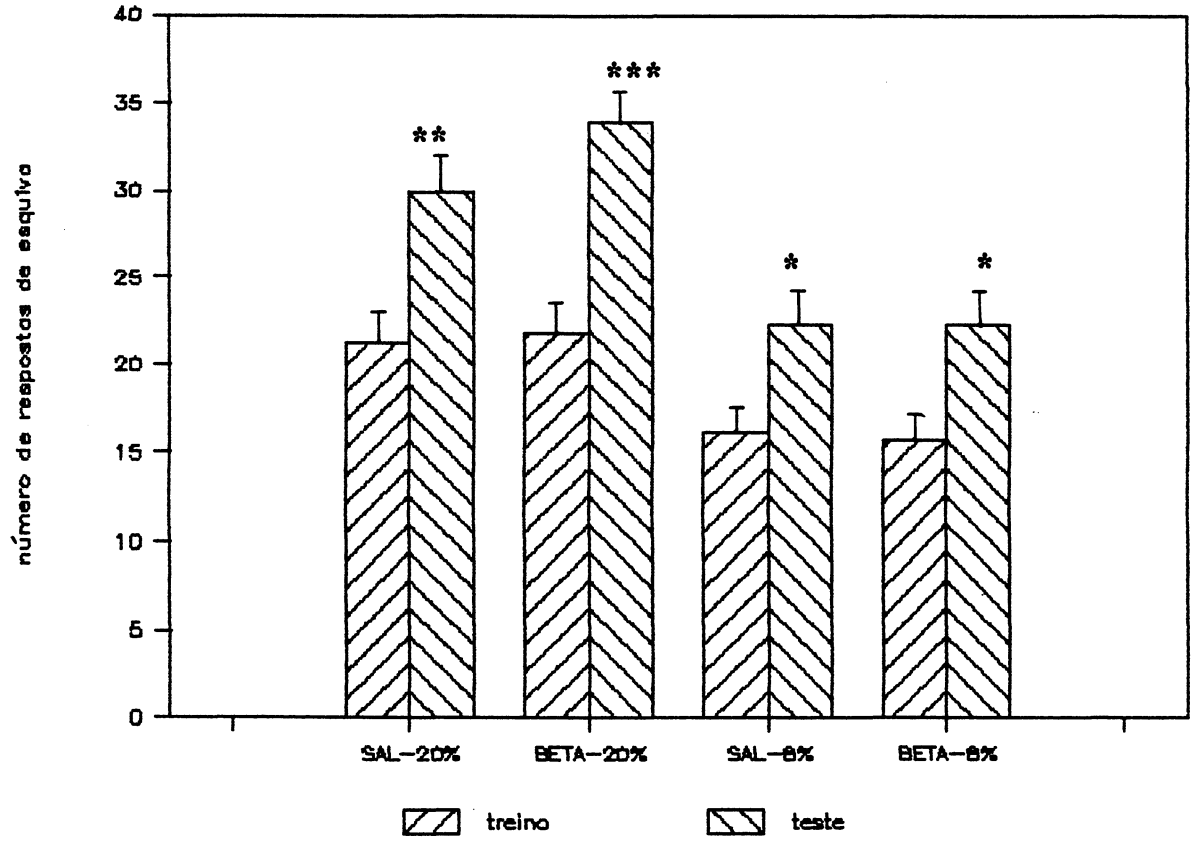

FIGURA 7. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de esquiva em ratos de 21 dias de idade submetidos `a esquiva ativa de duas vias usando 0,8 mA. Resultados expressos em média ± DP. O número de ninhadas em cada grupo foi 12.
Teste F para efeito simples: * p < 0,05, ** p < 0,005, *** p < 0,001.

2 - Esquiva inibitória.

a - Latência de descida da plataforma com choques de 0,2 mA. (B-endorfina 1 ug/Kg)

Os resultados da latência de descida da plataforma em esquiva inibitória, usando choques de 0,2 mA, são mostrados na Figura 8. A análise de variância para 2 (dietas) x 2 (drogas) x 2 (sessões) fatores indicou diferenças significativas em relação à dieta [$F(1,32) = 7,73$; $p < 0,001$; entre as sessões de treino e teste [$F(1,32) = 91,2$; $p < 0,001$] e interação entre dieta e sessões [$F(1,32) = 13,1$; $p < 0,001$]. As comparações posteriores indicaram que todos os grupos aumentaram a latência de descida da plataforma na sessão de teste, comparados com a sessão de treino: normal/salina [$F(1,32) = 9,99$; $p < 0,005$], normal/ B-endorfina [$F(1,32) = 5,39$; $p < 0,05$], desnutrido/salina [$F(1,32) = 44,76$; $p < 0,005$] e desnutrido/B-endorfina [$F(1,32) = 50,55$; $p < 0,005$]. No entanto, o grupo desnutrido apresentou uma maior latência quando comparado com o grupo normal, como pode ser observado pelo efeito significativo na análise de variância em relação a dieta e interação dieta e sessões. A administração de B-endorfina pós-treino não teve efeito sobre esta latência no dia do teste em ambos os grupos nutricionais. Portanto, usando esta intensidade de choque, a desnutrição provocou um aumento na latência de descida da plataforma no dia do teste comparado com os animais normais e a administração pós-treino de B-endorfina não prejudicou a evocação em ambos os grupos nutricionais.

b - Latência de descida da plataforma com choques de 0,8 mA. (B-endorfina 1ug/kg).

Os resultados da latência de descida da plataforma em esquiva inibitória, usando choques de 0,8 mA, são mostrados na Figura 9. A análise de variância para 2 (dietas) x 2 (drogas) x 2 (sessões) fatores indicou diferenças significativas em relação às sessões de treino e teste [$F(1,32) = 119,4$; $p < 0,001$]. As comparações posteriores indicaram que todos os grupos aumentaram a latência de descida da plataforma no dia do teste, comparados com a sessão de treino: normal/salina [$F(1,32) = 23,27$; $p < 0,001$], normal/B-endorfina [$F(1,32) = 24,57$; $p < 0,001$], desnutrido/salina [$F(1,32) = 16,23$; $p < 0,001$] e desnutrido/B-endorfina [$F(1,32) = 33,80$; $p < 0,001$]. Portanto, nesta intensidade de choque, nem a desnutrição nem a administração pós-treino desta dose de B-endorfina tiveram efeito sobre o comportamento dos ratos nesta tarefa.

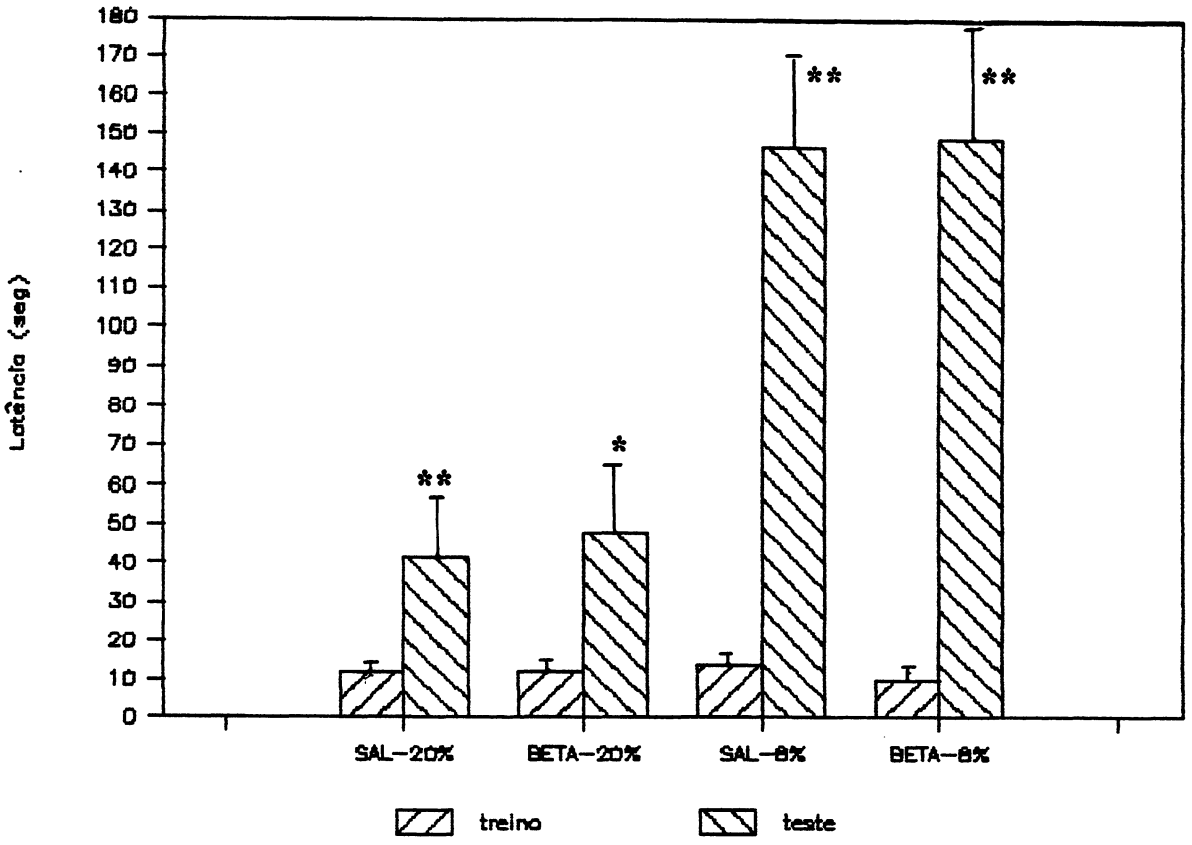

FIGURA 8. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina (1ug/Kg)sobre a latência de descida da plataforma em ratos de 21 dias idade submetidos à esquiva inibitória usando 0,2 mA. Resultados expressos em média ± EP. O número de ninhadas em cada grupo foi 9.

Teste F para efeito simples: * p < 0,05, ** p < 0,005.

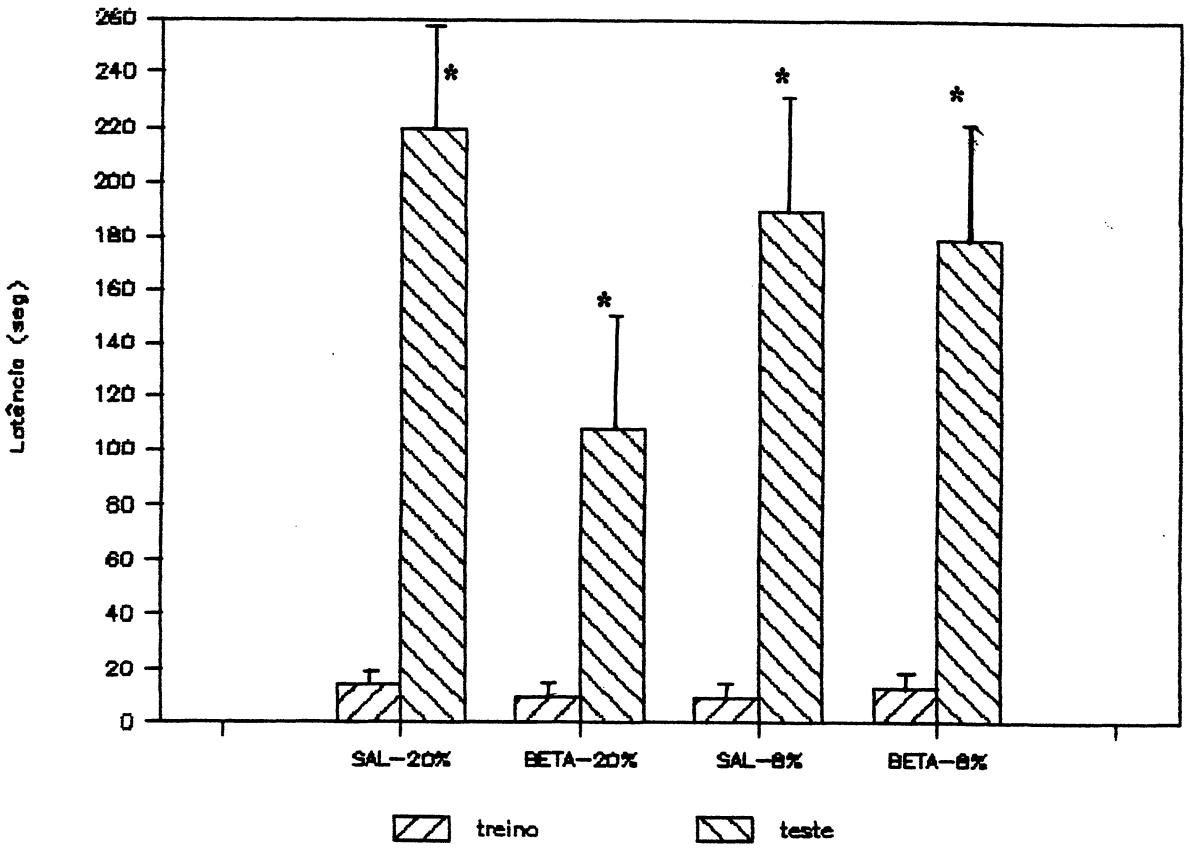

FIGURA 9. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina (1ug/Kg) sobre a latência de descida da plataforma em ratos de 21 dias de idade submetidos à esquiva inibitória usando 0,8 mA. Resultados expressos em média ± EP. O número de ninhadas em cada grupo foi 9.

Teste F para efeito simples: * p < 0,001.

c - Latência de descida da plataforma com choques de 0,2 mA (B-endorfina 2ug/kg).

Os resultados da latência de descida da plataforma em esquiva inibitória, usando com choques de 0,2 mA, são mostrados na Figura 10. A análise de variância para 2 (dietas) x 2 (drogas) x 2 (sessões) fatores indicou diferenças significativas em relação à dieta [$F(1,20) = 5,6$; $p < 0,05$] e entre as sessões de treino e teste [$F(1,20) = 35,9$; $p < 0,001$]. As comparações posteriores indicaram que somente o grupo normal injetado pós-treino com B-endorfina não apresentou diferenças significativas, na latência de descida da plataforma, entre treino e teste. Os demais grupos apresentaram um aumento nesta latência no dia do teste, comparados com o dia do treino: normal/salina [$F(1,20) = 10,65$; $p < 0,005$], desnutrido/salina [$F(1,32) = 15,47$; $p < 0,001$] e desnutrido/B-endorfina [$F(1,32) = 11,25$; $p < 0,005$]. Como houve efeito significativo da dieta, foi feita uma análise estatística pelo teste de raio multiplo do Duncan do somatório da latência de descida da plataforma do dia do treino e do teste. Os ratos desnutridos apresentaram uma maior latência de descida da plataforma (salina, 88,8; B-endorfina, 114,5) que os ratos normais (salina, 33,9; B-endorfina, 31,0), $p < 0,05$. Portanto, nesta intensidade de choque, a administração pós-treino de 2 ug/kg de B-endorfina prejudicou a evocação somente dos animais normais e a desnutrição provocou um aumento na latência de descida da plataforma.

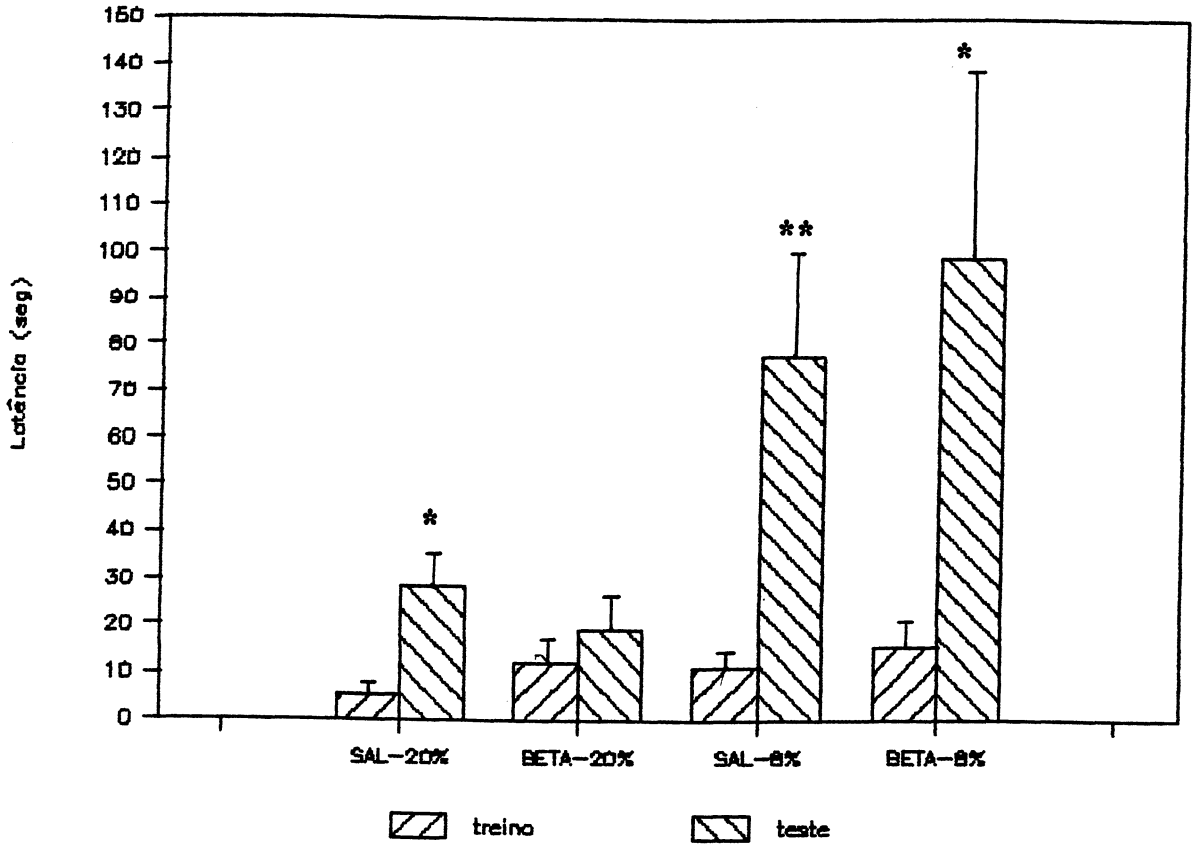

FIGURA 10. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina (2ug/Kg) sobre a latência de descida da plataforma em ratos de 21 dias idade submetidos à esquiva inibitória usando 0,2 mA. Resultados expressos em média ± EP. O número de ninhadas em cada grupo foi 6.

Teste F para efeito simples: * p < 0,005, * p < 0,001.

d - Latência de descida da plataforma com choques de 0,8 mA (B-endorfina 2 ug/kg).

Os resultados de descida da plataforma em esquiva inibitória, usando choques de 0,8 mA, são mostrados na Figura 11. A análise de variância para 2(dietas) x 2(drogas) x 2(sessões) fatores indicou diferenças significativas em relação às sessões de treino e teste [$F(1,20) = 166,1$; $p < 0,001$]. As comparações posteriores indicaram que todos os grupos aumentaram a latência de descida da plataforma no dia do teste, comparados com a sessão de treino: normal/salina [$F(1,20) = 40,67$; $p < 0,001$], normal/B-endorfina [$F(1,20) = 43,28$; $p < 0,001$], desnutrido/salina [$F(1,20) = 42,13$; $p < 0,001$] e desnutrido/B-endorfina [$F(1,20) = 40,37$; $p < 0,001$]. Portanto, nesta intensidade de choque, nem a desnutrição nem a administração pós-treino desta dose de B-endorfina tiveram efeito sobre o comportamento dos ratos nesta tarefa.

3 - Habituação ao campo aberto.

Os resultados das respostas de orientação são mostrados na Figura 12. A análise de variância para 2(dietas) x 2(drogas) x 2(sessões) fatores indicou diferenças não significativas em relação à dieta, sessões e drogas. Portanto, nesta idade ratos normais e desnutridos não mostraram habituação ao campo aberto com 2 minutos de sessão e a administração pós - treino de B-endorfina não teve efeito sobre a evocação dos ratos normais e desnutridos na sessão de teste.

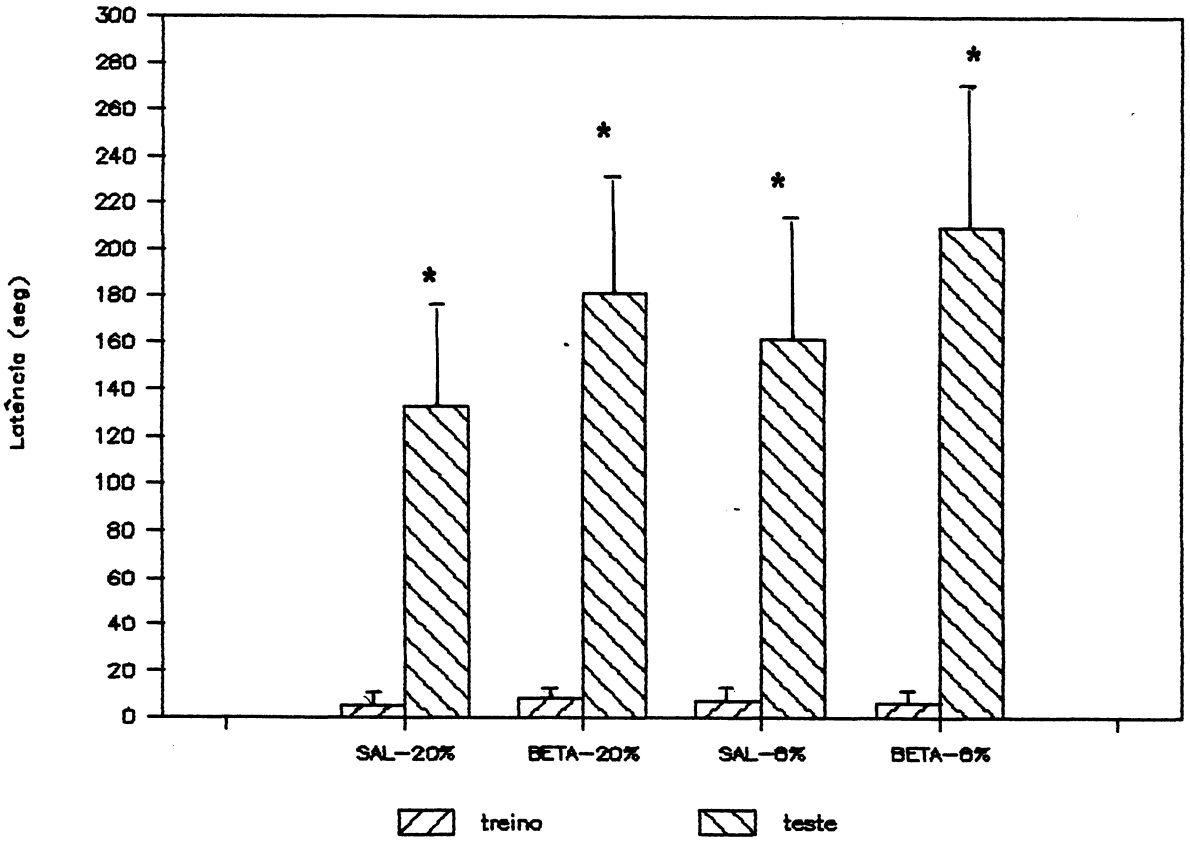

FIGURA 11. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina (2ug/Kg) sobre a latência de descida da plataforma em ratos de 21 dias de idade submetidos à esquiva inibitória usando 0,8 mA. Resultados expressos em média ± EP. O número de ninhadas em cada grupo foi 6.

Teste F para efeito simples: * p < 0,001.

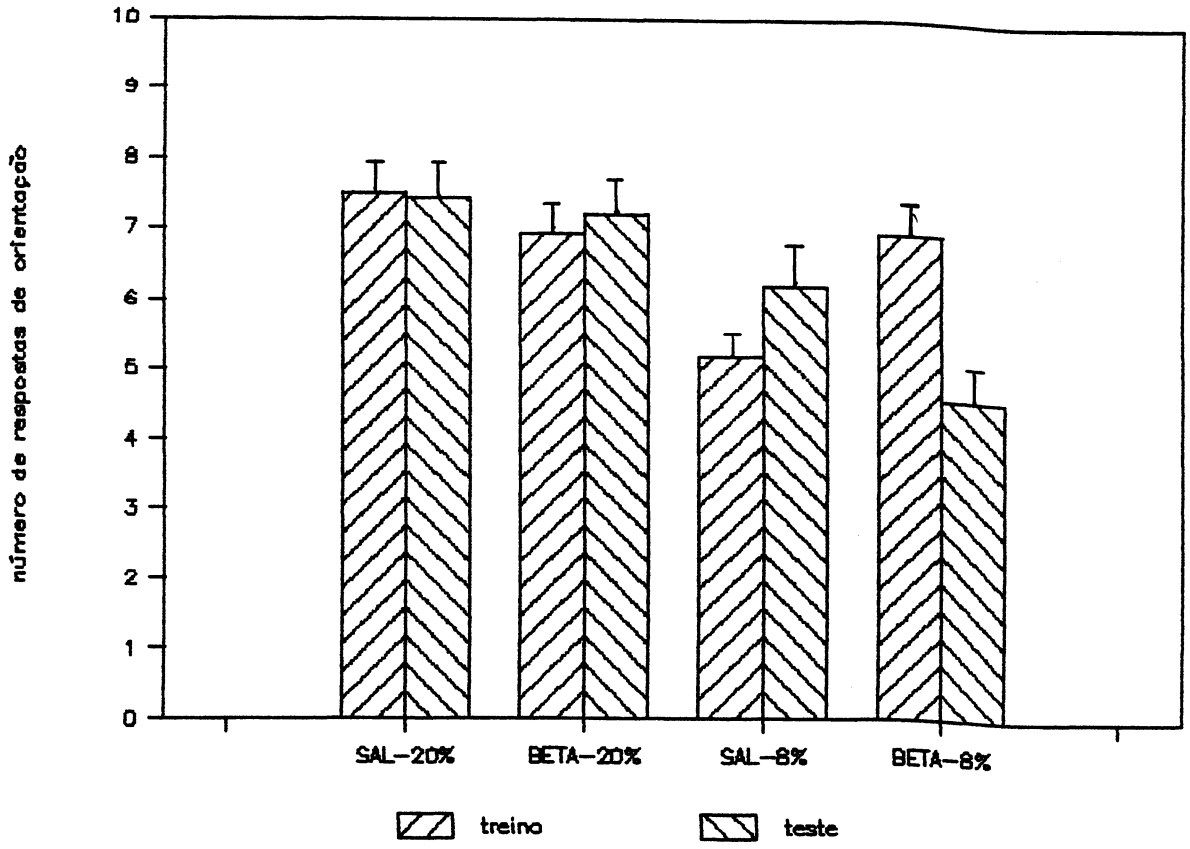

FIGURA 12. Efeito da desnutrição durante o aleitamento e da administração pós-treino de B-endorfina sobre o número de respostas de orientação em ratos de 21 dias idade submetidos ao campo aberto. Resultados expressos em média +/- DP. O número de ninhadas em cada grupo foi 9.

A análise de variância revelou diferencas não significativas.

EXPERIMENTO 9 - EFEITO DA DESNUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE A NOCICEPÇÃO DE RATOS COM 21 DIAS DE IDADE, SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO.

Vimos em experimento anterior, que ratos adultos normais submetidos à uma sessão de habituação em campo aberto apresentaram uma resposta antinociceptiva e este efeito não foi observado nos ratos adultos desnutridos. Neste experimento, resolvemos investigar se estes efeitos observados em ratos adultos, já estão presentes em ratos com 21 dias de idade.

Ratos normais e desnutridos com 21 dias de idade foram submetidos a uma sessão de habituação ao campo aberto. Dois minutos antes e 2 minutos após a esta sessão, os animais foram submetidos a medida da latência do reflexo de retirada da cauda de um estímulo doloroso (calor). Os grupos controle consistiam de ratos normais ou desnutridos que ao invés de serem submetidos ao campo aberto, ficavam na sua caixa-moradia.

Os resultados são mostrados na Tabela 16. A análise de variância para 2(dietas) x 2(controle/campo aberto) x 2(antes/após) fatores revelou diferencas não significativas em relação à dieta e entre as latências do reflexo de retirada da cauda antes e após da sessão de campo aberto.

TABELA 16 - EFEITO DA DENUTRIÇÃO DURANTE O ALEITAMENTO SOBRE NOCICEPÇÃO DE RATOS COM 21 DIAS DE IDADE SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO. (a)

	Normais		Desnutridos	
	Antes	Após	Antes	Após
Controle	3,5 + 0,4 (5)	4,3 + 0,8 (5)	4,4 + 1,0 (5)	4,1 + 0,6 (5)
Campo Aberto	3,9 + 0,8 (5)	4,8 + 1,6 (5)	4,4 + 0,5 (5)	5,0 + 1,6 (5)

a - Resultados expressos em média ± DP (número de ninhadas).

A análise estatística revelou diferenças não significativas.

DISCUSSÃO

A literatura sobre os efeitos neuroquímicos e comportamentais decorrentes da desnutrição apresenta resultados muitas vezes de difícil comparação devido aos diferentes métodos para provocar a desnutrição nos animais, diferente metodologia usada nas situações comportamentais e também devido à diferença de idade na qual um determinado parâmetro neuroquímico ou comportamental é analisado. Portanto, na discussão dos resultados desta tese as comparações com dados da literatura serão realizadas com os trabalhos que mais se aproximam da metodologia utilizada nesta tese. Porém, quando necessário, dados de trabalhos que utilizaram metodologia diferente serão citados. Os resultados desta tese serão discutidos seguindo a ordem dos experimentos, apresentados com o título resumido.

Experimento 1 - Caracterização do método de desnutrição.

A desnutrição durante o aleitamento provocou uma diminuição no peso corporal e cerebral dos ratos aos 21 dias de idade. Os ratos desnutridos durante o aleitamento e reabilitados nutricionalmente até os 3 meses de idade continuaram a apresentar um menor peso cerebral e corporal, comparados aos ratos normais (Tabela 2). Portanto, os efeitos da desnutrição durante o aleitamento sobre peso cerebral e corporal persistiram mesmo após a reabilitação nutricional.

Apesar da desnutrição durante o aleitamento diminuir o peso cerebral dos animais, não foram encontradas diferenças nos pesos, conteúdo de DNA, RNA e proteínas em hipocampo, hipotálamo, e

caudato-putamen aos 21 dias (Tabela 3) e aos 3 meses de idade (Tabela 4). Sabe-se que as regiões subcorticais são as menos afetadas pela desnutrição (97). Como discutiremos posteriormente, a ausência de efeito da desnutrição sobre estes parâmetros nada nos revela sobre a funcionalidade destas estruturas.

Experimento 2 - Desnutrição e incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais.

Ratos adultos normais apresentam um aumento na incorporação de aminoácidos em proteínas de estruturas cerebrais, 4 horas após terem sido submetidos a um treino (85, 171). Os ratos adultos normais apresentaram este aumento na incorporação de leucina em proteínas de hipotálamo e caudato-putamen, 4 horas após terem sido submetidos a uma sessão de 50 choques 0,8 mA (Tabela 6.). Os ratos desnutridos durante o aleitamento e reabilitados até a vida adulta não apresentaram este aumento na incorporação de leucina em proteínas de hipotálamo e caudato-putamen, quando submetidos a uma sessão de choques. Nos ratos desnutridos, esta sessão de choques causou uma diminuição na incorporação de leucina em proteínas do hipotálamo, e em caudato putamen o nível basal desta incorporação foi menor quando comparado com os ratos normais não treinados.

Não foram observadas diferenças entre os grupos nutricionais na latência de fuga ao choque. Talvez, o choque usado tenha sido muito forte, pois foi demostrado que ratos desnutridos apresentam menor latência de fuga somente em intensidades de choques consideradas "intermediárias". Esta menor

latência de fuga ao choque apresentada pelos ratos desnutridos não é observada com o uso de choques muito fracos ou muito fortes (111, 168). Portanto, na sessão de fuga ao choque não foi observada diferença comportamental entre os grupos nutricionais, porém houve diferença no parâmetro neuroquímico. Estes resultados sugerem que as respostas fisiológicas desencadeadas pelo choque nos ratos desnutridos são diferentes das observadas nos ratos normais.

A participação de hormônios, liberados com o treino, neste aumento de incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais foi investigado por alguns autores (85, 150). Ratos normais demedulectomizados aprendem tão bem uma tarefa de esquiva ativa de duas vias quanto os animais submetidos ao controle cirúrgico (127, 164), mas não apresentam este aumento na incorporação de leucina em proteínas cerebrais, e em caudato-putamen houve inclusive uma diminuiçao nesta incorporação 4 horas após a sessão de treino (85). A mediação hormonal deste parâmetro metabólico parece ser um fenômeno complexo, pois apesar da necessidade da medula adrenal intacta para que este fenômeno seja observado, a injeção de adrenalina foi incapaz de promover um aumento nesta incorporação semelhante aquela observada horas após o treino (85). Os resultados encontrados nos ratos normais demedulectomizados se assemelham com os encontrados nos ratos desnutridos, ou seja ausência deste aumento de incorporação de leucina em proteinas cerebrais observado horas após o treino. Cines (31) encontrou um menor peso da adrenal em ratos com 55 dias de idade desnutridos durante a lactação, e vários autores (

3, 161) que provocaram desnutrição gestacional e lactacional tem relatado que ratos adultos desnutridos apresentam uma hipofunção adrenal. Portanto, seria interessante investigar a possibilidade de uma relação entre ausência deste pico de incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais (apresentado pelos ratos desnutridos) e hipofunção adrenal. No entanto outras disfunções hormonais encontradasnos ratos desnutridos (36) não devem ser descartadas como um dos fatores responsáveis por este efeito na incorporação de aminoácido em proteínas.

Este aumento na incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais tem sido interpretado como sendo inespecífico ao aprendizado e mais relacionado ao estresse que acompanha uma sessão de treino (85, 149). Logo, poderíamos concluir que a desnutrição durante o aleitamento acarreta alterações irreversíveis em determinadas respostas relacionadas ao estresse.

Experimento 3 - Desnutrição e liberação de B-endorfina do hipotálamo.

Ratos adultos normais quando submetidos a um treino ou mesmo somente a caixa de condicionamento apresentam uma diminuição na imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo. Esta diminuição na imunorreatividade tem sido interpretada como liberação de B-endorfina do hipotálamo devida a exposição do animal a um ambiente novo, pois se o animal for exposto novamente a mesma situação não mais apresenta esta liberação (84, 142). Nesta tese foi confirmado este dado da literatura (Tabelas 7 e 8), pois os ratos adultos normais submetidos a uma sessão com 50 choques 0,8 mA ou a somente alguns choques 0,2 mA (esquiva

inibitória) apresentaram uma diminuição na imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo. Os ratos adultos desnutridos durante o aleitamento não apresentaram esta diminuição na imunorreatividade tipo B-endorfina no hipotálamo, quando submetidos aos treinos citados acima. Além disso, os ratos desnutridos apresentaram um menor nível basal de B-endorfina no hipotálamo comparado com os ratos normais.

Perry et al., trabalhando com ratos desnutridos desde a fase de aleitamento até a vida adulta, demonstraram que os ratos desnutridos apresentavam um nível basal de B-endorfina cerebral e hipofisária menor que os ratos normais, e também não houve liberação de B-endorfina cerebral quando submetidos ao treino (141). A desnutrição de ratos adultos por 1 mês (113) ou a privação de alimento pós-desmame por 4 dias (184) não alterou os níveis de B-endorfina hipotalâmica. Logo, as alterações observadas no sistema B-endorfinérgico devidas à desnutrição parecem depender mais de uma adequada alimentação durante a fase de aleitamento.

Além da desnutrição, sabe-se que ratos tratados com B-endorfina durante a fase neonatal apresentam um menor nível de B-endorfina no hipotálamo e áreas extra-hipotalâmicas (124). Por outro lado, sabe-se que a liberação de B-endorfina do hipotálamo em ratos adultos normais submetidos a um treino é abolida pela transecção do fornix, via que conecta o sistema septo-hipocampal ao hipotálamo (130). A administração crônica de alcool em ratos provoca uma diminuição da síntese do precursor da B-endorfina (POMC) na hipófise, reduzindo portanto os níveis de B-endorfina

nesta estrutura, e provoca também uma redução da liberação desta substância 'in vitro'(159). Portanto, parece que interferências farmacológicas ou nutricionais, em determinados períodos críticos do desenvolvimento, ou mesmo outros tipos de tratamentos (lesão, alcool) na vida adulta, podem provocar alterações no sistema B-endorfinérgico. Portanto, os mecanismos pelos quais os ratos adultos desnutridos durante o aleitamento apresentam alteração no sistema B-endorfinérgico hipotalâmico é de difícil explicação e no momento seria totalmemte especulativo. Neste experimento pode se concluir que a desnutrição provocou uma alteração irreversível na resposta do sistema B-endorfinérgico relacionada com a novidade.

Experimento 4 - Desnutrição e administração pós-treino de B-endorfina em ratos adultos.

Apesar da vasta literatura sobre desnutrição e aprendizado a questão sobre os efeitos comportamentais da desnutrição, ainda não foi adequadamente respondida. O desempenho de um animal em uma dada tarefa é dependente dos processos associativos e motivacionais do animal (9, 50, 61). Um dado estímulo apresentado na sessão comportamental pode ter um significado diferente para o rato desnutrido comparado com o normal, e consequentemente gerar diferentes níveis motivacionais comprometendo assim o desempenho do animal (92). Portanto, algumas precauções devem ser tomadas nas generalizações e interpretações dos efeitos da desnutrição na capacidade do animal aprender, baseadas no desempenho dos ratos desnutridos em uma dada tarefa (92, 192). Os dados da literatura sobre o

desempenho dos ratos desnutridos em uma tarefa de esquiva ativa de duas vias e esquiva inibitória tem sido inconclusivos. Alguns autores mostraram que a desnutrição pode melhorar (109, 110, 111, 126), piorar (106, 126) ou não ter efeito (65,74, 106, 126) sobre o desempenho dos animais nestes tipos de tarefas. Talvez, as discrepâncias dos resultados sejam devidas à ausência de uniformidade na realização destas tarefas (37, 109). Nesta tese, não foi encontrado efeito da desnutrição sobre o desempenho dos animais no treino e no teste da tarefa de esquiva ativa de duas vias (Figuras 1 e 2) e na esquiva inibitória (Figuras 3 e 4) nas duas intensidades de choques. Na esquiva ativa de duas vias, os ratos desnutridos apresentaram uma menor latência de fuga ao choque em 0,2 mA (Tabela 9), interpretado como uma maior reatividade ao choque (110, 111, 168). Esta maior reatividade ao choque poderia acarretar uma alteração nos aspectos motivacionais e consequentemente uma alteração no desempenho desta tarefa (92). Porém, como já comentado acima não houve diferenças entre o desempenho dos ratos normais e desnutridos.

O aumento na intensidade de choque de 0,2 para 0,8 mA acarretou uma diminuição no número das respostas de esquiva na esquiva ativa de duas vias e um aumento na latência sobre a plataforma na esquiva inibitória em ambos os grupos nutricionais (Tabela 10). Tem sido relatado que o aumento na intensidade de choque diminui a atividade locomotora dos animais ("freezing"), o que melhora o desempenho na esquiva inibitória e diminui na esquiva ativa de duas vias (9).

Em relação a habituação ao campo aberto, ratos adultos

normais e desnutridos apresentaram uma diminuição do número de respostas de orientação ("rearing") na sessão de teste, indicando que ambos os grupos nutricionais se habituaram ao campo aberto (Figura 5). Portanto, também nesta tarefa a desnutrição não teve efeito sobre o desempenho dos animais. Quando um animal é exposto a um campo aberto várias respostas podem ser quantificadas (ambulação, defecação, orientação etc), as quais são normalmente utilizadas para inferir sobre o comportamento exploratório e/ou "emocionalidade" do animal (12, 186). Estas respostas são influenciadas por uma série de variáveis: manuseio prévio dos animais (108), tempo da exposição ao campo aberto (38, 57), presença ou não de objetos dentro da arena (200), idade (53), fatores genéticos (26), tempo de desnutrição e de reabilitação (57), luminosidade, barulho, etc. (12). Portanto, existe uma difilculdade nas comparações entre os resultados dos efeitos da desnutrição sobre o comportamento exploratório, baseados nestas respostas. Autores que usaram o mesmo método de desnutrição utilizado nesta tese, mostraram que ratos desnutridos fazem menos respostas de orientação que os ratos normais aos 85 dias e aos 50 dias de idade não houve diferenças, mas o tempo de exposição dos ratos ao campo aberto foi de 9 minutos (57). Um outro estudo mostrou que os ratos desnutridos não apresentam habituação em relação à resposta de orientação e o tempo de exposição foi de 3 minutos (38). No entanto, ratos submetidos à desnutrição gestacional e lactacional apresentaram habituação à resposta de orientação porém, em níveis diferentes (58).

Os sistemas opióides endógenos tem sido relacionados com comportamento exploratório, pois animais injetados com

agonistas opióides apresentam um aumento do comportamento exploratório, e antagonistas provocam uma diminuição (93, 94). Por outro lado, B-endorfina é liberada do hipotálamo quando o animal é exposto a uma situação de novidade (84), a qual poderia entre outras funções ativar o comportamento exploratório do animal frente a novidade. Desde que os ratos desnutridos não apresentam liberação de B-endorfina pela novidade, inicialmente esperava-se que ratos normais e desnutridos pudessem apresentar diferenças nas respostas de orientação (a qual pode ser considerada como um comportamento exploratório). No entanto, não foram encontradas diferenças entre os grupos nutricionais nesta tarefa. Talvez, um tempo maior de exposição dos ratos ao campo aberto e/ou sucessivas exposições dariam uma melhor visão dos efeitos da desnutrição sobre o comportamento exploratório dos ratos, e uma possível relação deste comportamento com a ausência de liberação de B-endorfina do hipotálamo.

Portanto, pode se concluir que a desnutrição não afetou o desempenho dos animais nas tarefas utilizadas.

Tem sido demonstrado que a administração intraperitoneal pós-treino de B-endorfina em ratos adultos normais prejudica a evocação da tarefa, na qual o animal foi treinado (78, 79, 80). A administração de nanogramas de B-endorfina por via intra-cérebro-ventricular pós-treino produz o mesmo efeito sobre a evocação (116). Provavelmente, este efeito da B-endorfina sobre a evocação seja mediado centralmente, apesar de apenas 20% ou menos da dose administrada intraperitonealmente alcança o cérebro (73, 148). Nesta tese, foi confirmado este dado da literatura em

algumas circunstâncias. A administração intraperitoneal pós-treino de B-endorfina prejudicou a evocação dos ratos adultos normais na esquiva ativa de duas vias 0,8mA, na esquiva passiva 0,2 mA e na habituação ao campo aberto (Figuras 2, 3 e 5).

A administração pós-treino de B-endorfina não prejudicou a evocação nos ratos adultos desnutridos nas situações citadas acima. Esta ausência de efeito da administração de B-endorfina pós-treino sobre a evocação nos ratos desnutridos não foi devida a uma maior sensibilidade ao choque, pois as respostas de orientação na habituação ao campo aberto também não foram alteradas pela B-endorfina.

O efeito de B-endorfina nos ratos normais foi dependente do tipo de tarefa e intensidade de choque. Como dito anteriomente, ratos normais e desnutridos que receberam salina pós-treino apresentaram um pior desempenho na sessão de teste em esquiva ativa de duas vias 0,8 mA e em esquiva passiva 0,2 mA. Dos treinos que envolvem choques, somente nestas duas situações a administração pós-treino de B-endorfina prejudicou a evocação nos ratos adultos normais.

Uma situação comportamental, além de promover liberação de B-endorfina do hipotálamo, acarreta também alterações em outros sistemas hormonais e de neurotransmissores centrais e periféricos (10, 49, 122, 129, 133). Algumas destas alterações parecem estar relacionadas com os aspectos motivacionais envolvidos no treino (61). As alterações devidas aos aspectos motivacionais parecem depender do desenho experimental do treino, por exemplo: treinos com uma ou várias provas, treinos sem choques, ou com choques de baixa ou alta intensidades, podem desencadear

contextos neurohumorais diferentes (10, 49, 61, 129, 133). Provavelmente, o efeito da administração de B-endorfina pós-treino sobre a evocação depende da interação entre B-endorfina e as alterações nos outros sistemas neurohumorais. Borrel et al., demonstraram que o efeito facilitador da administração pós-treino de naloxone é dependente da intensidade de choque. Neste experimento, os ratos foram familiarizados com a caixa de condicionamento (sem choques), e logo a seguir treinados em esquiva inibitória com diferentes intensidades de choques (0,3 ou 0,5 mA) e administrados pós-treino com naloxone. O efeito facilitador sobre a evocação provocado por naloxone somente foi observado em ratos treinados com 0,5 mA (43). Provavelmente, as duas situações liberem B-endorfina do hipotalamo, pois no procedimento de familiarização não havia choques, e as diferentes intensidades de choques possam desencadear um diferente padrão de respostas neurohumorais. Izquierdo et al., (80) observaram que o efeito de uma dada dose de B-endorfina pós-treino sobre a evocação depende das condições do treino. Ratos treinados em diferentes tamanhos de plataforma e intensidades de choques (plataforma grande / 1mA ou plataforma pequena / 0,3mA) a dose de B-endorfina requerida para produção de amnésia em cada situação foi diferente. No entanto, a liberação de B-endorfina do hipotálamo é independente do tamanho da plataforma e da presença ou não de choques (142). Portanto, o efeito amnésico de uma dada dose de B-endorfina pós-treino depende de outros fatores, além da liberação de B-endorfina hipotalâmica pela novidade (14, 83).

Partindo da hipótese que o efeito da B-endorfina pós-treino sobre a evocação seja dependente da interação entre B-endorfina e do padrão de alterações nos outros sistemas neurohumorais, os quais parecem estar relacionados com os aspectos motivacionais de cada situação experimental, pode se ter as seguintes hipóteses para a ausência de efeito de B-endorfina pós-treino sobre a evocação dos ratos desnutridos.

a - Ratos desnutridos não liberam B-endorfina do hipotálamo, quando submetidos a um treino, além de apresentarem um nível basal de B-endorfina no hipotálamo menor que os ratos normais.

b - A desnutrição provoca alteração nos receptores opióides: na afinidade pelos opióides e/ou no número destes receptores.

c - Ratos desnutridos submetidos a um treino apresentam um padrão de respostas nos sistemas neurohumorais diferente daquele observado em ratos normais.

Em relacão ao item a- não seria uma explicação suficiente, desde que ratos normais liberam B-endorfina hipotalâmica em todas as tarefas até o momento analisada, mas o efeito de B-endorfina pós-treino só se manifesta em determinadas situações.

Em relação ao item b- sabe-se que manipulações farmacológicas (15, 87, 104) ou comportamentais (156) durante o rápido desenvolvimento cerebral alteram o número de receptores opióides. Desde que a desnutrição provoca diminuição no nível basal de B-endorfina do hipotálamo e abole a sua liberação pela novidade, pode ser que como consequência a desnutrição também altere os receptores opióides. Portanto, alteração no número de receptores opióides devida à desnutrição é uma hipótese que não deve ser descartada como uma possível explicação para a ausência do efeito

da B-endorfina exógena sobre a evocação.

Em relação ao item c- ratos adultos desnutridos na fase gestacional e lactacional submetidos a um treino em esquiva inibitória (3) ou estresse com éter (161) apresentam uma menor liberação de corticoesteróide comparado com ratos normais. Outros autores mostraram que ratos desnutridos, desde a fase gestacional até a idade adulta, submetidos a uma sessão de choques apresentam um padrão de respostas nos sistemas neurotransmissores diferente daquele observado nos ratos normais (175). Além disso, uma outra maneira de se avaliar a funcionalidade de um dado sistema neurotransmissor e/ou hormonal seria através da responsividade destes sistemas a determinados agonistas e antagonistas. Ratos submetidos a outros tipos de desnutrição apresentam uma menor responsividade a drogas que afetam o sistema serotoninérgico (66), uma menor resposta pressora a adrenalina e noradrenalina (96), uma diferente resposta ao tratamento com anfetamina (25), etc. Apesar das alterações citadas acima terem utilizado métodos de desnutrição diferente daquele usado nesta tese, pode ser que a desnutrição lactacional também provoque um padrão de respostas diferente frente a um treino , estresse e/ou quando injetados com determinadas drogas que afetam sistemas hormonais e de neurotransmissores.

Portanto, existe a possibilidade das tres hipóteses citadas acima serem importantes para a ausência de efeito da administração de B-endorfina pós-treino sobre a evocação nos

ratos desnutridos.

Experimento 5 - Desnutrição e antinocicepção em ratos adultos.

O sistema opióide tem sido relacionado na mediação de respostas analgésicas (180). Estudos prévios mostraram que ratos testados pela primeira vez na placa quente apresentam latências maiores que aqueles familiarizados com a placa não funcional (16). Ratos confrontados a um gato, ou expostos a um ambiente com odor de citronela apresentaram diminuição na sensitividade/reatividade à injeção de formalina (107). Ratos expostos à choques ou somente observar um outro rato recebendo choques apresentaram uma resposta antinociceptiva semelhante (52). A simples exposição do rato a um campo aberto ou a um treino de esquiva inibitória induz uma resposta antinociceptiva. No entanto, a familiarização dos ratos ao campo aberto abole esta resposta (163). A resposta antinociceptiva induzida pelas situações experimentais citadas acima foram revertidas pela administração de antagonistas opióides (52, 107, 163), sugerindo portanto a participação de sistemas opióides endógenos.

Nesta tese, vimos que a exposição ao campo aberto induziu uma resposta antinociceptiva em ratos adultos normais, e esta resposta não foi observada nos ratos adultos desnutridos (Tabela 11). Ratos normais liberam B-endorfina hipotalâmica, quando expostos a uma situação nova, e os ratos desnutridos não apresentam esta liberação. A familiarização de ratos adultos normais com o ambiente novo abole a liberação de B-endorfina hipotalâmica (84) e esta resposta antinociceptiva (163). As

últimas observações citadas sugerem que, provavelmente esta resposta antinociceptiva induzida pela situação nova se deva à liberação de B-endorfina hipotalâmica, já que os outros peptídios opióides não são alterados pela novidade (29). Portanto, pode ser que a ausência desta resposta antinociceptiva nos ratos desnutridos seja devida à ausência de liberação de B-endorfina hipotalâmica. Apesar da forte relação entre liberação de B-endorfina hipotalâmica e esta resposta antinociceptiva, outras interpretações não devem ser descartadas.

Portanto, poderíamos concluir que a desnutrição lactacional, seguida de reabilitação nutricional até a idade a adulta, provoca efeitos irreversíveis nos animais. Os ratos desnutridos, quando submetidos a um treino, não apresentaram aumento de síntese proteica cerebral, liberação de B-endorfina hipotalâmica, resposta antinociceptiva e efeito amnésico da administração pós-treino de B-endorfina. Em termos comportamentais, a desnutrição não afetou o desempenho dos animais, e a única alteração encontrada foi um aumento na reatividade ao choque.

Experimentos 6 e 7 - Desnutrição e imunorreatividade tipo B-endorfina em ratos de 21 dias de idade.

Nesta idade ambos os grupos nutricionais apresentaram o mesmo nível basal na imunorreatividade tipo B-endorfina hipotalâmica, e não apresentaram diminuição de imunorreatividade quando submetidos ao campo aberto (Tabela 13) ou esquiva inibitória (Tabela 12). Como não houve diferenças entre os grupos

nutricionais e entre controle e treinado, pensou - se que esta ausência de efeito fosse devida ao fato dos ratos normais já terem liberado B-endorfina com a retirada da mãe da caixa-moradia (desmame), pois este procedimento era realizado antes do ínicio do experimento com os filhotes. Sabe - se que a separação maternal pelo menos antes dos 21 dias de idade provoca determinadas respostas na ninhada que são revertidas por naloxone (95, 137, 172). Portanto, resolveu - se investigar o possível efeito da separação maternal sobre a imunorreatividade tipo B-endorfina hipotalâmica dos filhotes. A separação maternal também não alterou o nível de B-endorfina hipotalâmica em ambos os grupos nutricionais (Tabela 14). Os resultados com ratos de 21 dias de idade diferiram daqueles encontrados com ratos adultos, pois nem a desnutrição nem o treino alterou o nível de B-endorfina hipotalâmica. Talvez, a ausência de alteração no nível de B-endorfina hipotalâmica em ratos jovens, seja devida à imaturidade deste sistema em relação ao parâmetro analisado. No entanto, a ausência de alterações devida à desnutrição e ao treino possam ser mediadas por mecanismos diferentes. Logo, a ausência de efeito da desnutrição nos níveis basais de B-endorfina hipotalâmica (nos ratos jovens desnutridos) e de liberação com novidade (nos ratos joves normais) se deve a fatores relacionados ao desenvolvimento.

Sabe-se que a estimulação por K+ induz liberação "in vitro" de B-endorfina de hipotálamo de rato adulto (134). A liberação espontânea de B-endorfina do hipotálamo médio basal e a induzida por K+ aumenta com a idade. Aos 10 dias de idade a liberação espontânea e a K+ - induzida é baixa. No entanto, aos 20 dias

esta liberação é maior do que a observada aos 10 dias e não difere da liberação observada aos 45 dias de idade (72). Estes dados sugerem que atividade de neurônios que contém B-endorfina aumenta durante o período pré-desmame, mas isto não significa que os processos fisiológicos que ativam a liberação de B-endorfina hipotalâmica pela novidade sejam funcionais em ratos com 21 dias de idade. Provavelmente, outros sistemas de neurotransmissores, os quais são importantes na indução de liberação de B-endorfina hipotalâmica pela novidade (130) ainda não estejam funcionalmente maduros nesta idade (5).

Um outro ponto importante a ser discutido é que o anticorpo usado tem reação cruzada com os precursores e as outras formas de B-endorfina (já comentado em material e métodos). Assim, os resultados de imunorreatividade de B-endorfina representa a soma de todas estas formas. Tem sido demonstrado que em hipotálamo de rato normal adulto, B-endorfina (1-31) contribui com 55% desta imunorreatividade, e as outras formas com 45% (195, 196). Em ratos jovens esta distribuição parece ser diferente, pois um peptídio menor que B-endorfina (1-31), provavelmente (1-27) ou (1-26), nao é detectado em hipotálamo de ratos com 14 dias de idade, e seu aparecimento aumenta no hipotálamo entre vigésimo dia e quadragésimo quinto dia de vida (72). Estes dados sugerem que os mecanismos que participam do processamento da B-endorfina continuam a se desenvolver após o período de desmame (21 dias de idade). Talvez, o desenvolvimento dos mecanismos envolvidos no processamento da B-endorfina seja um importante fator para o aparecimento das alterações encontradas nos ratos

adultos.

Experimento 8 - Desnutrição e administração pós-treino de β-endorfina em ratos de 21 dias de idade.

De um modo geral, o desempenho em esquiva ativa de duas vias dos ratos desnutridos aos 21 dias de idade que receberam salina pós-treino foi pior que aquele observado nos ratos normais, nas duas intensidades de choques analisadas (Figuras 6 e 7). Este efeito não foi observado quando treino e teste foram analisados separadamente, mas sim quando a análise foi feita em conjunto (treino + teste). No entanto, ambos os grupos nutricionais apresentaram diferenças treino/teste, ou seja, memória.

Em esquiva inibitória, o desempenho dos ratos desnutridos que receberam salina pós-treino foi melhor que aquele observado nos ratos normais, mas somente em 0,2 mA (Figuras 8 e 10). Em 0,8 mA não houve diferenças entre os grupos nutricionais (Figuras 9 e 11).

Estes resultados confirmam estudos prévios, pois os ratos desnutridos apresentaram pior desempenho em esquiva ativa de duas vias e melhor desempenho em esquiva inibitória (169). Uma maior sensibilidade ao choque facilita o desempenho em esquiva inibitória e diminui as respostas em esquiva ativa de duas vias (9). Porém, em esquiva ativa de duas vias não foi encontrada maior reatividade ao choque nos ratos desnutridos nas duas intensidades de choques analisadas (Tabela 15). Desde que as características do desempenho dos ratos desnutridos, em esquiva inibitória e ativa de duas vias, são de uma maior sensibilidade

ao choque, provavelmente nesta idade o método usado para a medida da latência de fuga ao choque não tenha sido adequado. Na caixa de condicionamento as distâncias entre as barras, através das quais os ratos levavam choques, era de 1 cm e os ratos desnutridos são bem menores que os ratos normais. Pode ser que esta diferença de tamanho e a distância entre as barras tenha prejudicado a fuga ao choque nos ratos desnutridos.

Em relação ao campo aberto, ratos normais e desnutridos que receberam salina pós-treino apresentaram o mesmo desempenho nas sessões de treino e de teste (Figura 12). Logo, ambos os grupos nutricionais não se habituaram ao campo aberto. Sabe-se que o número de respostas de orientação dentro de uma sessão de habituação ao campo aberto aumenta com o desenvolvimento (53). Pode ser que a ausência de habituação nesta idade seja devida ao reduzido comportamento exploratório dos animais. Talvez, os ratos nesta idade apresentassem habituação, se fosse permitido aos animais um maior tempo de exposição ao campo aberto. Uma outra hipótese é a possível relação existente entre B-endorfina e comportamento exploratório (93, 94). Pode ser que o reduzido comportamento exploratório dos ratos jovens normais, seja devido à ausência de liberação de B-endorfina do hipotálamo quando submetidos a uma situação nova.

Portanto, nesta idade a desnutrição aumentou, diminui, ou não teve efeito no desempenho dos animais, pois esta alteração foi dependente do tipo de tarefa.

A administração pós-treino de B-endorfina, nas doses que prejudicam a evocação em ratos adultos normais, não tiveram

efeito nos ratos normais e desnutridos com 21 dias de idade em nenhuma das tarefas analisadas (Figuras 6, 7, 8, 9 e 12). Em esquiva inibitória 0,2 mA, somente quando o dôbro da dose de B-endorfina foi administrada é que a evocação foi prejudicada. Porém, mesmo com o dôbro da dose a B-endorfina continuou sem efeito nos ratos desnutridos (Figura 10).

Várias possibilidades poderiam ser levantadas para a ausência de efeito da administração de B-endorfina pós-treino em ratos jovens normais, nas doses que tem efeito nos ratos adultos normais. Primeiro, ratos jovens não liberam B-endorfina hipotalâmica quando submetidos a um treino. Segundo, os sistemas de neurotransmissores e de hormônios não estão amadurecidos nesta idade. Sabe-se que, os níveis cerebrais de serotonina e de noradrenalina aumentam até a quinta - sexta semana pós-natal e de dopamina até a vida adulta (5), e a resposta de corticoesteróide a estresse nesta idade é menor do que a observada em ratos adultos (8). Pode ser inclusive que este segundo item determine o primeiro. Terceiro, o desenvolvimento de receptores opióides desenvolve - se principalmente durante a fase de aleitamento, mas um desenvolvimento mais gradual e observado até a vida adulta (13, 32) e existe um diferencial desenvolvimento dos subtipos dos receptores opióides (100). Talvez, o efeito de uma dada dose de B-endorfina exógena sobre a evocação dependa da maturação de um subtipo específico de receptor opióide ou do desenvolvimento de populações de receptores em regiões específicas. Provavelmente, a ausência de efeito de uma dada dose de B-endorfina pós-treino sobre a evocação em ratos jovens normais se deva as 3 possibilidades

citadas acima. Talvez, também devido à imaturidade do sistema nervoso é que o efeito da B-endorfina sobre a evocação em ratos normais jovens, somente tenha se manifestado quando o dôbro da dose foi administrada. No momento, faltam dados na literatura que suporte uma maior explicação para estes dados.

A diferença ou ausência de efeito da administração de outros opióides em ratos normais jovens, quando comparados com os efeitos encontrados em ratos adultos, já foi observada por alguns autores. Leu-encefalina administrada antes de uma sessão de teste reverte a amnésia induzida por dióxido de carbono em ratos adultos normais, mas não em ratos com 20 dias de idade (22). A administração de uma dada dose de morfina em ratos jovens e adultos produz efeitos diferentes sobre a atividade locomotora e determinados comportamentos esteriotípados induzídos pela morfina só são observados numa fase posterior ao desmame (30).

A ausência de efeito da administração de B-endorfina nos ratos jovens desnutridos, não necessáriamente se deve aos mesmos mecanismos comentados para os ratos normais, pois além da imaturidade funcional do sistema nervoso para o parâmetro analisado, os ratos desnutridos apresentam alterações outras nos níveis de determinados neurotransmissores (162, 169) e hormônios (3, 161). Estas outras alterações apresentadas pelos ratos desnutridos jovens devem ser relevantes para a não manifestação do efeito da B-endorfina sobre a evocação, pois este efeito não foi observado nem quando uma dose maior de B-endorfina foi administrada.

Experimento 9 - Desnutrição e antinocicepção em ratos de 21 dias de idade.

Em experimento anterior foi visto que a exposição ao campo aberto induziu uma resposta antinociceptiva em ratos normais adultos e esta resposta não foi observada nos ratos desnutridos adultos. Aos 21 dias de idade, ambos os grupos nutricionais não apresentaram esta resposta antinociceptiva quando expostos ao campo aberto (Tabela 16).

Estudos prévios demonstraram que manipulações opióides influenciam nocicepcão em ratos neonatos (13, 95, 172, 197). Estes estudos relatam que a separação dos filhotes (6 ou 10 dias de idade) da mãe por 10 minutos ou mais provoca uma resposta antinociceptiva nos filhotes. Esta resposta é bloqueada por naloxone, sugerindo a participação de mecanismos opióides (95, 172). Um dos possíveis candidatos para esta resposta antinociceptiva seria a liberação de B-endorfina hipofisária. Sabe-se que ratos neonatos liberam B-endorfina da hipófise a partir do terceiro dia de vida, quando submetidos a uma situação estressante (197). Respostas analgésicas também são observadas em ratos administrados com morfina a partir da primeira semana pós-natal e com B-endorfina somente a partir do décimo quarto dia, mas a dose de B-endorfina administrada foi demais alta (1 ug i.c.v.) (197). Como a dose de B-endorfina necessária para induzir analgesia foi muito alta e somente a partir do décimo quarto dia de vida, provavelmente a resposta antinociceptiva induzida pela separação materna em ratos neonatos seja devida a outros mecanismos opióides e não a B-endorfina endógena.

Dinorfina, um outro peptídio opióide endógeno, tem sido implicada nas respostas analgésicas em neonatos, via receptores kappa (17, 60) e este tipo de analgesia é dependente de mecanismo serotoninérgico (185). Provavelmente, a resposta antinociceptiva observada em ratos neonatos seja devida a mecanismos dinorfinérgico e serotoninérgico.

Portanto, existe a possibilidade que respostas antinociceptivas observadas em ratos adultos e ratos jovens não necessáriamente operam através dos mesmos mecanismos. Além disso, a funcionalidade de um dado sistema durante o desenvolvimento do animal parece depender do parâmetro analisado. Um certo estímulo ambiental pode ser relevante numa determinada fase da vida e consequentemente ativar um dado sistema, e numa outra idade este mesmo estímulo não ter o mesmo significado para o animal e consequentemente não ativar este sistema. Um exemplo são as alterações no sistema serotoninérgico devidas à privação maternal, que diminuem gradualmente durante o desenvolvimento e desaparecem em ratos com 24 dias de idade (173).

Não foi possível observar os efeitos da desnutrição sobre o sistema B-endorfinérgico nos ratos jovens através das situações analisadas nesta tese, pois os ratos jovens normais não responderam aos parâmetros analisados como os ratos adultos normais. Zhang et al., trabalhando com nocicepção e morfina, utilizaram dois grupos de ratos com 7 dias de idade, um dos grupos pesava 12g e os pêlos eram mais escassos (desnutridos?) e o outro 20g. A dose de morfina para produção de analgesia nos ratos que pesavam menos foi 4 vezes maior do que a dos ratos mais pesados (197). Se realmente o grupo mais leve era desnutrido,

este estudo mostrou que dependendo do parâmetro analisado, determinadas alterações no sistema opióide devidas à desnutricao (?) podem ser detectadas nesta idade.

Portanto, de acordo com parâmetros analisados nesta tese aos 21 dias de idade não foram observadas diferenças entre ratos normais e desnutridos em relação ao sistema B-endorfinérgico. Provavelmente, devido à imaturidade funcional deste sistema em relação às situações analisadas.

CONCLUSÕES

A desnutrição durante o aleitamento provocou alterações irreversíveis nos animais, pois aos 3 meses de idade os animais apresentaram: um menor peso corporal e cerebral, ausência de aumento na síntese proteica que acompanha uma sessão de estresse, uma maior reatividade ao choque, ausência de liberação de B-endorfina frente a uma situação nova, um menor nível basal de B-endorfina no hipotálamo, ausência de efeito amnésico da B-endorfina e ausência de antinocicepção induzida pela novidade.

Ratos jovens normais e desnutridos não apresentaram liberação de B-endorfina do hipotálamo quando submetidos a uma situação nova, efeito amnésico da administração pós-treino de B-endorfina e antinocicepção induzida pela novidade.

Em relação ao sistema B-endorfinérgico a única diferença entre ratos desnutridos de 21 dias e adultos durante o aleitamento foi a diminuição no nível basal de B-endorfina hipotalâmica, a qual foi encontrada nos ratos adultos. Portanto, os efeitos da desnutrição sobre o sistema B-endorfinérgico foram mais facilmente observados na idade adulta, provavelmente devidos à imaturidade funcional deste sistema aos 21 dias de idade em relação aos parâmetros analisados.

A desnutrição, dependendo do tipo de treino, prejudicou (esquiva ativa de duas vias), melhorou (esquiva inibitória) ou não teve efeito (habituação ao campo aberto)nos desempenhos dos animais aos 21 dias de idade. Este efeito foi revertido pela reabilitação nutricional e/ou desenvolvimento, pois aos 3 meses

de idade não foram observadas alterações nos desempenhos dos animais.

Portanto, pode se concluir que a desnutrição durante o aleitamento abole determinadas respostas do animal frente ao estresse e a novidade, e estes efeitos são independentes da reabilitação nutricional. Já o efeito da desnutrição sobre o desempenho dos animais foi dependente da reabilitação nutricional e/ou desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

1 . ABBEY, H. & HOWARD, E. Statistical procedures in developmental studies on species with multiple offsprings. **Developmental Psychobiology** 6: 329-335, 1973.

2 . ADLARD, B.P.F. & DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. III. Development of four enzimes in the brains of normal and undernourished rats. **Brain Research** 28: 97-107, 1971.

3 . ADLARD, B.P.F. & SMART, J.L. Adrenocortical function in rats subjected to nutritional deprivation in early life. **Journal of Endocrinology** 54: 99-105, 1972.

4 . AGHAJANIAN, C.K. & BLOOM, F.E. The formation synaptic junctions in developing rat brain. A quantitative electron microscopic study. **Brain Research** 6: 716-727, 1967.

5 . AGRAWAL, H.C.; GLISSON, S.N.; HIMWICH, W.A. Changes in monoamines of rat brain durind posnatal ontogeny. **Biochemistry Biophysic Acta** 130: 511-513, 1966.

6 . AKIL, H.; WATSON, S.J.; YOUNG, E.; LEWIS, M.E.; KHACHATURIAN, H.; WALKER, J.M. Endogenous opioids: biology and function. **Annual Reviews Neuroscience** 7: 223-255, 1984.

7 . AKIL, H.; YOUNG, E.; WALKER, J.M.; WATSON, S. The many possible roles of opioid and related peptides in stress-induced analgesia. IN: KELLY, D.D. ed. **Stress-induced analgesia** pp. 140-153, 1986.

8 . ALLEN, C. & KENDALL, J.W. Maturation of circadian rhythm of plasma costicosterone in the rat. **Endocrinology** 80: 926-930, 1967.

9 . ANISMAN, H. Aversively motivated behavior as a tool in psychopharmacology analysis. IN: ANISMAN, H. & BIGNAMI, G. eds. **Psychopharmacology of aversively motivated behavior.** Plenum Publishing Corporation, New York. pp. 1-61, 1978.

10. ANISMAN, H. Neurochemical changes elicited by stress. IN: ANISMAN, H & BIGNAMI, G. eds. **Psychopharmacology of aversively motivated behavior.** Plenum Publishing Corporation, New York. pp. 119-161, 1978.

11. ARBILA, S. & LANGER, S.Z. Morphine and B-endorphin inhibit release of noradrenalin from cerebral cortex but not of dopamine from striatum. **Nature** 271: 559-561, 1978.

12. ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour** 21: 205-235, 1973.

13. AUGUY-VALETE, A.; CROS,J.; GOUDARDERES, Ch.; GOUT,R.; PONTONNIER, G. Morphine analgesia and cerebral opiate receptors: a developmental study. **British Journal Pharmacology** 63: 303-308, 1978.

14. BARATTI, C.M.; INTROINI, I.B.; HUYGENS, P. Possible interation between muscarinic and opioid peptidergic systems during memory consolidation in mice. **Behavioral Neural Biology** 40: 155-169, 1984.

15. BARDO, M.T.; BHATNAGAR, R.K.; GEBHART, G.F. Differential effects of chronic morphine and naloxone on opiate receptors, monoamines, and morphine-induced behaviors in prewealing. **Developmental Brain Research** 4: 139-147, 1982.

16. BARDO, M.T. & HUGHES, R.A. Exposure to a nonfunctional hot plate as a factor the assessment of morphine-induced

analgesia and analgesic tolerance in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 10: 481-485, 1978.

17. BARR, G.A.; PAREDES, W.; ERIKSSON, K.; ZUKIN, R.S..Kappa receptor mediated analgesia in the developing rat. **Developmental Brain Research** 29: 145-152, 1986.

18. BAYON, A.; SHOEMAKER, W.J.; BLOOM, F.E.; MAUSS, A.; GUILLEMIN, R. Perinatal development of the endorphin- and enkephalin containing systems in the rat brain. **Brain Research** 179: 93-101, 1979.

19. BELLUZI, J.D.; GRANT, N.; GARSKY, V.; SARANTAKIS, D.; WISE, C.D.; STEIN, L. Analgesia induced in vivo by central administration of enkephalin in rat. **Nature** 260: 625-626, 1976.

20. BENSTED, J.P.M.; DOBBING, J.; MORGAN, A.S.; REID, R.T.W. PAYLING, W.G. Neuroglial development and myelination in the spinal cord of the chick embryo. **Journal Embryological & Experimental Morphological** 5: 428-432, 1957.

21. BLOOM, F.E.; BATTENBERG, E.; ROSSIER, J.; LING, N.; LEPALLUOT, J.; VARGO, T.M.; GUILLEMIN, R. Endorphins are located in the intermediate and anterior lobes of pituitary glads and not in the neurohypophysis. **Life Science** 20: 43-48, 1977.

22. BLOZOVSKI, D. & MANDENOFF, A. Attenuation of CO2-induced retrograde amnesia by enkephalins in 20- and 34-day-old rats. **Behavioral Neural Biology** 35: 200- 204, 1982.

23. BODNAR, R.J. Types of stress wich induced analgesia. IN: TRICKLEBANK, M. & CURSON, G. eds. **Stress induced analgesia.** New York, John Wiley, pp. 19-32, 1984

24. BOND, N. & DI GIUSTO, E. Open-field behavior as a function of age, sex, and repeated trials. **Psychological Reports** 41: 571-574, 1977.

25. BRIONI, J.D.; KELLER, E.A.; LEVIN, L.E.; CORDOBA, N.; ORSINGHER, O.A. Reactivity to amphetamine in perinatally undernourished rats: Behavioral and neurochemical correlates. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 24: 449-454, 1986.

26. BROADHURST, P.L. Psychogenetics of emotionality in the rat. **Annual New York Academic Science** 159: 806-811, 1969.

27. BRUNING, J.L. & KINTZ, B.L. Analysis of variance (Part 2) and Supplemental computations for analysis of variance (Part 3). In: **Computations Handbook of Statistics**. Scott, Foresman and Company, Glenview, pp. 16-105 and pp. 106-151, 1968.

28. BURBACH, J.P.H.; LOEBER, J.G.; VERHOEF, J.; WIEGANT, V.M.; DE KLOET, E.R.; DE WIED, D. Seletive conversion of B-endorphin into peptides related to Y- and alfa-endorphin. **Nature** 283: 96-97, 1980.

29. CARRASCO, M.A.; PERRY, M.L.; DIAS, R.D.; WOFCHUK, S.T.; IZQUIERDO, I. Effects of tones, footshocks, shuttle avoidance, and eletroconvulsive shocks on met-enkephalin immunoreactivity of rat brain. **Behavioral Neural Biology** 34: 1-4, 1982.

30. CAZA, P.A. & SPEAR, L.P. Ontogenesis of morphine-induced behavior in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 13: 45-50, 1980.

31. CINES, B.M. & WINICK, M. Behavioral and physiological effects of early handling and early malnutrition in rats. **Developmental Psychobiology** 12 (4): 381-389, 1979.

32. CLEDENINN, N.J.; PETRAITIS M.; SIMON, E.J. Ontological development of opiate receptors in rodent brain. **Brain Research** 118: 157-160, 1976.

33. CHRETIEN, M.; SEIDAH, N.G.; SCHERRER, H. Endorphines: strutures, roles et biogenese. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology** 59: 413-431, 1981.

34. CRAGG, B.G. The development of cortical synapses during starvation in the rat. **Brain** 95: 143-150, 1972.

35. CRAVIOTO, H.M.; RANDT, C.T.; DERBY, B.M.; DIAZ, R. A quantitative ultrastructural study of synapses in the brains of mice following early life undernutrition. **Brain Research** 118: 304-306, 1976.

36. CRIM, M.C. & MUNRO, H.N. Protein-energy malnutrition and endocrine function. IN: DeGROOT, L.J.; CAHILL, G.F.; MARTINI, L.; ODELL, W.D.; POTTS, J.T.; STEINBERGER, E.; WINEGRAD, A.I. eds. **Endocrinology**. Grune & Stratton, New York. pp. 1987-2000, 1979.

37. CRNIC, L.S. Effects of infantile undernutrition on adult learning in rats: methodological and design problems. **Psychological Bulletin** 83(4): 715-728, 1976.

38. CRNIC, L.S. Effects of nutrition and environment on brain biochemistry and behavior. **Developmental Psychobiology** 16 (2): 129-145, 1983.

39. CRNIC, L.S. & CHASE, H.P. Models of infantile undernutrition in rats: effects on milk. **Journal of Nutrition** 108: 1755-

1760, 1978.

40. DAVINSON, A.N. & DOBBING, J. Myelination as a vulnerable period in brain development. **British Medical Bulletin** 22: 1- 5 ,1966.

41. DAYTON, C.M. Repeated measures designs. IN: La Mar, N. and Stires, A. eds **The design of educational experiments.** McGraw-Hill, New York, pp. 244-282, 1970.

42. DEBASSIO, W.A. & KEMPER, T.L. The effects of protein on neuronal migration in rats. **Developmental Brain Research** 20: 191-196, 1985.

43. DEL CERRO, S. & BORRELL, J. Naloxone influences retention behavior depending on the degree of novelty inherent to the training situation. **Physiology and Behavior** 35: 667-671, 1984.

44. DOBBING, J. The influence of early nutrition on the development and myelination of the brain. **Proceedings Royal Society London** 159: 503-509, 1964.

45. DOBBING, J. & SMART, J.L. Vulnerability of developing brain and behaviour. **British Medical Bulletin** 30: 164-168, 1974.

46. DOBBING, J. & SANDS, J. Vulnerability of developing brain. **Biology of the Neonate** 19: 363-378, 1971.

47. DONNER, G. Hormone-dependent brain development. **Psychoneuroendocrinology** 8 (2): 205-212, 1983.

48. DUNLOP, D.S.; VAN ELDEN, W.; LAJTHA, A. Optimal conditions for protein synthesis in incubated slices of rat brain. **Brain Research** 99: 303-318, 1975.

49. DUNN, A.J. & KRAMARCY, N.R. Neurochemical responses in

stress: relationships between the hypothalamic-pituitary-adrenal and catecholamine systems. IN: IVERSEN, L.L.; IVERSEN, S.D.; SNYDER, S.H. eds. **Handbook of Psychopharmacology**, Plenum Publishing Corporation, 18: pp. 455-515, 1984.

50. ENDROCZI, E. Pavlovian conditioning and adaptive hormones. IN: LEVINE, S. ed. **Hormones and Behavior**, Academic Press, New York and London, 6: 173-207, 1972.

51. ENWONWU, C.O. & GLOVER, V. Alterations in cerebral protein metabolism in the progeny of protein-caloric-deficient rats. **Journal of Nutrition** 103: 61-73, 1973.

52. FANSELOW, M.S. Odors released by stressed rats produce opioid analgesia in unstressed rats. **Behavioral Neuroscience** 99 (3): 589-592, 1985

53. FILE, S.E. The ontogeny of exploration in the rat: Habituation and effects of handling. **Developmental Psychobiology** 11 (4): 321-328, 1978.

54. FISH, I. & WINICK, M. Effect of malnutrition on regional growth of the developing rat brain. **Experimental Neurology** 25: 534-540, 1969.

55. FLECK, R & MUNRO, H.N. The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation. **Biochemistry Biophisic Acta** 55: 571-583, 1962.

56. FRANKOVA, S. & BARNES, R.H. Effect of malnutrition in early life on avoidance conditioning and behavior of adult rats. **Journal of Nutrition** 96: 485-493, 1968.

57. FRANKOVA, S. & BARNES, R.H. Influence of malnutrition in

early life on exploratory behavior of rats. **Journal of Nutrition** 96: 477-484, 1968.

58. GALLO, P.V. Physiological and behavioral consequenses of maternal post-weaning protein restriction. **Physiology and Behavior** 26: 77-84, 1981.

59. GAMBETTI, P.; AUTILIO-GAMBETTI, L.; RIZZUTO, N.; SHAFER, B.; PFAFF, L. Synapses and malnutrition: quantitative ultrastuctural study of rat cerebral cortex. **Experimental Neurology** 43: 464-473, 1974.

60. GIORDANO, J. & BARR, G.A. Morphine- and ketocyclazocine-induced analgesia in the developing rat: differences due to type of noxious stimulus and body topography. **Developmental Brain Reseach** 32: 247-253, 1987.

61. GOLD, P.E. & McGAUGH, J.L. A single-trace, dual-process view of memory storage processes. IN: DEUTSCH, D. & DEUTSCH, J.A. eds. **Short-Term Memory**. New York, pp.356-378, 1975.

62. GOODLETT, C.R.; VALENTINO, M.L.; RESNICK, O.; MORGANE, P.J. Altered development of responsiveness to clonidine in severely malnourished rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 23: 567-572, 1985.

63. GRAF, L.; SZEKELY, J.I.; RONAI, A.Z.; DUNAI-KOVACS, Z.; BAJUSZ, S. A comparative study on analgesic effect of met-enkephalin and related lipotrophin fragments. **Nature** 263: 240-241, 1976.

64. GRAY, J.A. **The neuropsychology of anxienty: an enquiry into the function of the septo-hippocampal system**. Oxford, Claredon, 1982.

65. GUTHRIE, H.A. Severe undernutrition in early infancy and behavior in rehabilitated albino rats. **Physiology and Behavior** 3: 619-623, 1968.

66. HALL, R.D.; LEAHY, J.P.; ROBERTSON, W.M. Hyposensitivity to serotonergic stimulation in protein malnourished rats. **Physiology and Behavior** 31: 187-195, 1983.

67. HAYES, R.L.; BENNETT, G.J.; NEWLON, P.G.; MAYER, D.J. Behavioral and phisiological studies of non-narcotic analgesia in the rat elicited by certain environmental stimuli. **Brain Research** 155: 69-90, 1978.

68. HAYNES, L.W.; SMYTH, D.G.; ZAKARIAN, S. Immunocytochemical localization of B-endorphin (lipotrophin C-fragment) in the developing rat spinal cord and hypothalamus. **Brain Research** 232: 115-128, 1982.

69. HEBB, D.O. Drives and the C.N.S. (Conceptual Nervous System). **Psychological Reviews** 62 (4): 243-254, 1955.

70. HENNESSY, J.W. & LEVINE, S. Stress, arousal, and pituitary-adrenal system: a psychoendocrine hypothesis. **Progress in Psychobiology and Physiological Psychology** 8: 133-178, 1979.

71. HERNANDEZ, R.J. Effect of malnutrition and 6-hydroxydopamine on early postnatal development of noradrenaline and serotonine content in the rat brain. **Biology of the Neonate** 30: 181-186, 1976.

72. HOMPES, P.G.A.; VERMES, I.; TILDERS, F.J.H.; SCHOEMAKER, J. Immunoreactive Beta-endorphin in hypothamus of female rats: changes in content and release during prepubertal development. **Developmental Brain Research** 5: 281-286,

1982.

73. HOUGHTEN, R.A.; SWANN, R.W.; LI, C.H. B-endorphin: Stability, clearence behavior, and entry into the central nervous system after intravenous injection of tritiated peptide in rats and rabbits. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** 77: 4588-4591, 1980.

74. HOWARD, E.; OLTON, D.S.; JOHNSON, C.T. Active avoidance and brain DNA after posnatal food deprivation in rats. **Developmental Psychobiology** 9(3): 217-221, 1976.

75. HSUEH, A.M.; SIMONSON, M.; KELLUM, M.J.; CHOW, B.F. Perinatal undernutrition and the metabolic and behavioral development of the offspring. **Nutrition Reports International** 7: 437-441, 1973.

76. HUGHES, J.; KOSTERLITZ, H.W.; SMITH, T.M. The distribution of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in the brain and peripheral tissues. **British Journal Pharmacology** 61: 639-647, 1977.

77. INY, L.J.; GIANOULAKIS, C.; PALMOUR, R.M.; MERNEY, M.J. The B-endorphin response to stress during posnatal development in the rat. **Developmental Brain Research** 31: 177-181, 1987.

78. IZQUIERDO, I. Effect of B-endorphin and naloxone on acquisition, memory and retrieval of shuttle avoidance and habituation learning in rats. **Psychopharmacology** 69: 111-115, 1980.

79. IZQUIERDO, I. Endogenous state-dependency: memory depends on the relation between the neurohumoral and hormonal states present after training and at the time of testing. IN:

LINCH, G.; McGAUGH, J.L.; WEINBERGER, N.M. eds. **Neurobiology of learning and memory.** New York, Guilford, pp.33-350, 1984.

80. IZQUIERDO, I. & DIAS, R.D. Effect of ACTH, epinephrine, B-endorphin, naloxone, and of the combination of naloxone or B-endorphin with ACTH or epinephrine on memory consolidation. **Psychoneuroendocrinology** 8: 81-87, 1983.

81. IZQUIERDO, I. & DIAS, R.D. Endogenous state dependency: memory regulation by post-training and pre-testing administration of ACTH, B-endorphin, adrenaline and tyramine. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research** 16: 55-64, 1983.

82. IZQUIERDO, I. & DIAS, R.D. Influence of memory of post-training or pre-test injections of ACTH, vasopressin, epinephrine, and B-endorphin and their interaction with naloxone. **Psychoneuroendocrinology** 10: 165-172, 1985.

83. IZQUIERDO, I. & GRAUNDEZ, M. Memory facilitation is due to release of dopaminergic and beta-adrenergic systems from tonic inhibition. **Psychopharmacology** 67: 265-268, 1980.

84. IZQUIERDO, I.; SOUZA, D.O.; DIAS, R.D.; CARRASCO, M.A.; VOLKMER, N.; PERRY, M.L.; NETTO, C.A. Effect of various behavioral training and testing procedures on brain B-endorphin-like immunoreactivity, and possible role of B-endorphin in behavioral regulation. **Psychoneuroendocrinology** 70: 173-177, 1984.

85. IZQUIERDO,I.; VENDITE, D.; SOUZA, D.O.; DIAS, R.D.; CARRASCO, M.A.; PERRY, M.L. Some neurochemical effects of behavioral training and their relevance to learning and memory

modulation. IN: CAPUTTO,R. & MARSAN, C.R. eds., **Neural Transmission, Learning and Memory**, Raven Press, New York. pp. 221-235, 1982

86. JENSEN, T.S. & SMITH, D.F. Effect of emotions on nociceptive threshold in rats. **Physiology and Behavior** 28: 597-599, 1982.

87. JOHNSON, F.E.; HUDD, C.; LaREGINA, M.C.; BEINFELD,M.C.; TOLBERT, D.L.; SPAIN, J.W.; SZUCS, M.; COSCIA, C.J. Exogenous cholecystokinin (CCK) reduces neonatal rat brain opioid receptor density and CCK levels. **Developmental Brain Research** 32: 139-146, 1987.

88. JONES, D.G. & DYSON, S.E. The influence of protein restrition, rehabilitation and changing nutritional status on synaptic development: A quantitative study in rat brain. **Brain Research** 208: 97-111, 1981.

89. JORDAN, T.C.; HOWELLS, K.F.; McNAUGHTON, N.; HEATLIE, P.L. Effects of early undernutrition on hippocampal development and function. **Research Experimental Medicine** 180: 201-207, 1982.

90. KANT, G.J.; MOUGEY, E.H.; PENNINGTON, L.L.; MEYERHOFF, J.L. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma B-endorphin, B-LPH, corticosterone and prolactin. **Life Science** 33: 2657-2663, 1983.

91. KAPKALA, L. Discordant changes between immunoreactive ACTH and B-endorphin in rat brain and pituitary during early development. **Brain Research** 364: 350-359, 1986.

92. KATZ, H.B. The influence of undernutrition on learning

performance in rodents. **Nutrition Abstracts and Reviews Series 'R'** 50(11): 767-784, 1980.

93. KATZ, R.J. Exploration as a functional correlate of endorphins. **Journal of Theoretical Biology** 77: 537-538, 1979.

94. KATZ, R.J. Naltrexone antagonism of exploration in the rat. **International Journal of Neuroscience** 9: 49-51, 1979.

95. KEHOE, P. & BLASS, E.M. Behaviorally functional opioid systems in infant rats: II. Evidence for pharmacological, phisiological, and psychological mediation of pain and stress. **Behavioral Neuroscience** 100 (5): 624-630, 1986.

96. KELLER, E.A.; MUNARO, N.I.; ORSINGHER, O.A. Peripheral adrenergic subsensitivity in adult rats undernourished at perinatal age. **Archives International Pharmacodynamic** 268: 88-94, 1984.

97. KEMPER, L.T.; PASQUIER, D.A.; DARZEN, S., Effect of a low protein diet on the anatomical development of subcortical formations. **Brain Research Bulletin** 3: 443-450, 1978.

98. KHACHATURIAN, H.; LEWIS, M.E.; SCHAFER, M.; WATSON, S.J. Anatomy of the CNS opioid systems. **Trends in Neuroscience** march: 111-119, 1985.

99. KOBAYASHI, R.M.; PALKOVITS, M.; MILLER, R.J.; CHANG, K.; CURTRECASAS, P. Brain enkephalin distribution is unaltered by hypophysectomy. **Life Science** 22: 527-530, 1978.

100. KORNBLUM, H.; HURLBUT, D.E.; LESLIE, F.M. Postnatal development of multiple opioid receptors in rat brain. **Developmental Brain Research** 37: 21-41, 1987.

101. KUHN, C. & SCHANBERG, S. Hormones and brain development. IN:

NEMEROFF, C.B. & DUNN, R.J. eds. **Peptides Hormones and Behavior.** Spectrum Publications, Inc. pp. 775-821, 1984.

102.KULKARNI, R.B. & GRITONTE, B.B. Effects of early undernutrition and subsequent rehabilitation on acetilcholine levels in rat brain. **Experientia** 38: 377-378, 1982.

103.KRIGMAM, M.R. & HOGAN, E.L. Undernutrition in the developing rat: effect upon myelination. **Brain Research** 107: 239-255, 1976.

104.LAHTI, R.A. & COLLINS, R.J. Chronic naloxone results in prolonged increases in opiate binding sites in brain. **European Journal of Pharmacology** 51: 185-186, 1978.

105.LEAHY, J.P.; STERN, W.C.; RESNICK, O.; MORGANE, P.J. A neuropharmacological analysis of central nervous system catecholamine system in developmental protein malnutrition. **Developmental Psychobiology** 11 (4): 361-370, 1978.

106.LEATHWOOD, P.; BUSH, M.; BERENT, C.; MAURON, J. Effects of early malnutrition on swiss white mice: avoidance learning after rearing in large litters. **Life Sciences** 14: 157-162, 1974.

107.LESTER, L.S. & FANSELOW, M.S. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. **Behavioral Neuroscience** 99 (4): 756-759, 1985.

108.LEVINE, S.; HALTMEYER, G.C.; KARAS, G.C.; DENENBERGER, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology Behavior** 2: 55-59, 1967.

109.LEVINE, S. & WIENER, S. A critical analysis of data on

malnutrition and behavioral deficits. **Advances in Pediatrics** 22: 113-136, 1975.

110.LEVITSKY, D.A. & BARNES, R.H. Effect of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli. **Nature** 225: 468-469, 1970.

111.LINCH, R. Passive avoidance behavior and response thresholds in adult male rats after early posnatal undernutrition. **Physiology and Behavior** 16: 27-32, 1976.

112.LIOTTA, R.S.; ADVIS, J.P.; KRAUSE, J.E.; McKELVY, J.F.; KRIEGER, T. Demonstration of in vivo systesis of pro-opiomelanocortin-, B-endorphin-, and alfa-melanocortin-like species in the adult rat brain. **The Journal of Neuroscience** 4 (4): 956-965, 1984.

113.LOCATELLI, V.; PETRAGLIA, F.; TIRLONI, N.; MULLER, E. B-endorphin concentrations in the hypothalamus, pituitary and plasma of streptozotocin-diabetic rats with and without insulin substituition therapy. **Life Science** 38: 379-386, 1985.

114.LOH, H.H.; BRASE, D.R.; SAMPATH-KHANNA, S.; MAR, J.B.; WAY, E.L. B-endorphin in vitro inhibition of striatal dopamine release. **Nature** 264: 567-568, 1976.

115.LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry** 193: 265-275, 1951.

116.LUCION, R.B.; ROSITO, G.; SAPPER, D.; PALMINI, R.L.; IZQUIERDO, I. Intracerebroventricular administration of nanogram amounts of B-endorphin and met-enkephalin causes retrogade amnesia in rats. **Behavioral Brain Research** 4:

111-115, 1982.

117.MARLMO, R.B. Activation: a neuropsychological dimension. **Psychological Review** 66 (6): 367-386, 1959.

118.MANS. R.J. & NOVELLI, G.D. Measurement of the incorporation of radioative aminoacids into protein by a filter-paper disc method. **Rrchives Biochemistry and Byophisics** 94: 48-53, 1961.

119.MASSARO, T.F.; LEVITSKY, D.A.; BARNES, R.H. Protein malnutrition in the rat: its effects on the maternal behavior and pup development. **Developmental Psychobiology** 7(6): 551-561, 1974.

120.MARICHINI, E.S.; MOLINA, V.A.; ORSINGHER, O.A. Persistent changes in cerebral catecholaminergic system after recovery of perinatally undernourished rats. **Journal of Nutrition** 109: 1045-1050, 1979.

121.MATTHIES, H. Biochemical, electrophisiological and morphological correlates of brightness discrimination in rats. In: Brazier, M.B.A. eds. **Brain Mechanisms in Memory and Learning**. New York, Raven Press, p. 197, 1979.

122.McGAUGH, J.L. Hormonal influences on memory storage. **Annual Review of Psychology** 13: 297-323, 1983.

123.MESSING, R.B.; JENSEN, R.A.; MARTINEZ, J.L.; SPIEHLER, V.R.; VASQUEZ, B.J.; SOUMIREU-MOURAT, B.; LIANG, K.C.; McGAUGH, J.L. Naloxone enhancement of memory. **Behavioral and Neural Biology** 27: 266-275, 1979.

124.MOLDOW, R.L.; KASTIN, A.J.; HOLLANDER, C.S.; COY, D.H.; SANDMAN, C.A. Brain B-endorphin-like immunoreactivity in

adult rats given B-endorphin neonatally. **Brain Research Bulletin** 7: 683-686, 1981.

125.MORRES E SANTOS, T. Dietary effects on in vitro rat neuronal protein synthesis during growth and development. **Brain Research Bulletin** 7: 385-389, 1981.

126.MORRIS, C.H. The effects of early malnutrition on one-way and two-way avoidance behavior. **Physiological Psychology** 2(2): 148-150, 1974.

127.MOYER, K.E. & BUNNELL, B.N. Effect of adrenal demedulation on an avoidance response in the rat. **Journal Comparative Physiological Psychology** 52: 215-216, 1959.

128.MUELLER, R.J. & COX, W.M.Jr. The effects of changes in diet on the volume and composition of rat milk. **Journal of Nutrition** 31: 249-259, 1946.

129.NATELSON, B.; TAPP, W.N.; ADAMUS, J.E.; MITTLER, J.C.; LEVIN, B.E. Humoral indices of stress in rats. **Physiology and Behavior** 26: 1049-1054, 1981.

130.NETTO, C.A.; CAVALHEIRO, E.A.; CARRASCO, M.A.; VOLKMER, N.; DIAS, R.D.; IZQUIERDO, I. Response of the rat brain B-endorphin system to novelty: importance of the fornix. **Behavioral Neural Biology** 43: 37-46, 1985.

131.NORTH, R.A. Opioid receptor types and membrane ion channels. **Trends in Neurosience** march: 114-117, 1986

132.NORTON, W.T. & PODUSLO, S.E. Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. **Journal of Neurochemistry** 21: 759-773, 1973.

133.OEI, T.P.S. & KING, M.G. Catecholamines and aversive learning. A review. **Neuroscience and Behavioral Reviews** 4:

161-173, 1980.

134.OSBORNE, H.; PRZEWLOCKI, R.; HOLLT, V.; HERZ, A. Release of B-endorphin from rat hypothalamus in vitro. **European Journal Pharmacology** 55: 425-428, 1979.

135.OTTINGER, D.R. & TARBE, G. Maternal food restriction: Effects on offspring behavior and development. **Developmental Psychobiology** 2: 7-9, 1968.

136.OVERTON, D.A. Experimental methods for the study of state-dependent learning. **Federation Proceedings** 33: 1800-1813, 1974.

137.PANKSEPP, J.; HERMAN, B.H.; VILBREG, T.; BISHOP, P.; DeESKINAZI, F.G. Endogenous opioids and social behavior. **Neuroscience Biobehavioral Reviews** 4: 473-487, 1980.

138.PARE, W.P. Age, sex, and strain differences in the aversive threshold to grid shock in the rat. **Journal Comparative Physiology Psychology** 69: 214-218, 1969.

139.PATEL, A.J.; DEL VECCHIO, M.; ATKINSON, D.J. Effects of undernutrition on the regional development of transmitter enzimes: glutamate descarboxilase and choline acetil transferase. **Developmental Neuroscience** 1: 41-53, 1978.

140.PEDROSA, M.L. & MORAES-SANTOS, T. Neuronal protein biosynthesis by neonatally malnourished and nutritionally recovered rats. **Brazilian Journal Medical Biolobical Research** 20: 331-338, 1987.

141.PERRY, M.L.; CARRASCO, M.A.; DIAS,R.D.; IZQUIERDO,I. B-endorphin-like immunoreactivity of, brain, pituitary gland and plasma of rats submitted to postnatal protein

malnutrition: effect of behavioral training. **Peptides** 5: 15-20, 1984.

142.PERRY, M.L.; DIAS, R.D.; CARRASCO, M.A.; IZQUIERDO, I. Step-down inhibitory avoidance training and B-endorphin-like immunoreactivity of rat hypothalamus and plasma. **Brazilian Journal Medical Biology Research** 16: 339-343, 1983.

143.PERT, C.B. & SNIDER, S.H. Opiate receptor binding of agonists and antagonist affected differentially by sodium. **Molecular Pharmacology** 10: 869-879, 1974.

144.PETERSON, N.A. & McKEAN, C.M. The effects of individual aminoacids on the incorporation of labelled aminoacids into proteins by brain homogenates. **Journal of Neurochemistry** 16: 1211-1217, 1969.

145.PLAUT, M.S. Studies of undernutrition in the young rat: methodological considerations. **Developmental Psychobiology** 3(3): 157-167, 1970.

146.RAJALAKSHMI, R.; GOVINDARAJAN, K.R.; RAMAKRISHNAN, C.V. Effect of dietary protein content on visual discrimination learning and brain biochemistry in the albino rat. **Journal of Neurochemistry** 12: 261-271, 1965.

147.RANDT, C.T. & BENNET, M.D. Behavioral and brain correlations in early life nutritional deprivation. **Archives of Neurology** 28: 167-172, 1973.

148.RAPOPORT, S.I.; KLEE, W.A.; PETTIGREW, K.D.; OHNO, K. Entry of opioid peptides into central nervous system. **Science** 207: 84-86, 1980.

149.REES, H.D.; BROGAN, L.; ENTINGH, D.J.; DUNN, A.; SHINKMAN, P.G.; DAMSTRA-ENTINGH, T.; WILSON, J.E.; GLASSMAN, E.

Effect of sensory stimulation on the uptake and incorporation of radiotive lysine into protein of mouse brain and liver. **Brain Research** 68: 143-156, 1974.

150.REES, H.D. & DUNN, R.J. The role of pituitary-adrenal system in the footshock-induced increase of [3-H]lysine incorporation into mouse brain and liver proteins. **Brain Research** 120: 317-325, 1977.

151.ROBAIN, O. & PONSOT, G. Effect of undernutrition on glial maturation. **Brain Research** 149: 379-397, 1978.

152.ROSSIER, J.; BAYON, A.; VARGO, T.M.; LING, N.; GUILLEMIN, R.; BLOOM, F.E. Radioimmunoassay of brain peptides: evaluation of methodology for assay of B-endorphin and enkephalin. **Life Science** 21: 847-852, 1977.

153.ROSSIER, J.; VARGO, T.M.; MINICK, S.; LING, N.; BLOOM, F.E.; GUILLEMIN, R. Regional dissociation of B-endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. **Proceeding National Academic Science** 74: 5162-5165, 1977.

154.SANDMAN, C.A.; McGIVERN, R.F.; BERKA, C.; WALKER, J.M.; COY, D.M.; KASTIN, A.J. Neonatal administration of B-endorphin produces "chronic" insensitivity to thermal stimuli. **Life Science** 25: 1755-1760, 1979.

155.SANTOS, R.C. & MORAES E SANTOS, T. Effet de la denutrition proteique-calorique neonatale sur la captation de 14-C-leucine et son incorporation dans les proteines cerebrales de rat. **Medicine et Nutrition** 17: 453-458, 1981.

156.SCHENK, S.; BRITT, M.D.; ATALAY, J. Isolation rearing decreases opiate receptor binding in rat brain.

Pharmacology Biochemistry and Behavior 16: 841-842, 1982.

157.SCHNEIDER, W.C. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. **Methods in Enzymology** 3: 680-684, 1957.

158.SEIZINGER, B.R.; HOLLT, V.; HERZ, A. Postnatal development of B-endorphin-related peptides in rat anterior and intermediate pituitary lobes: evidence for contrasting development of proopiomelacortin processing. **Endocrinology** 115: 136-142, 1984.

159.SEIZINGER, B.R.; HOLLT, V.; HERZ, A. Effects of chronic ethanol treatement on in vitro biosynthesis of pro-opiomelanocortin and its posttranslational processing to B-endorphin in the intermediate lobe of the rat pituitary. **Journal of Neurochemistry** 43: 607-613, 1984.

160.SERENI, F.; PRINCIPI,N.; PERLETTI, L.; SERENI, L.P. Undernutrition and developing rat brain. **Biology of the Neonate** 10: 254-265, 1966.

161.SHOEMAKER, W.J. & DALLMAN, M.F. Pituitary-adrenal function in perinatally undernourished rats. **Federation Proceeding** 32: 909 Abs, 1973.

162.SHOEMAKER, W.J. & WURTMAN, R.J. Effect of perinatal undernutrition of metabolism of catecholamines in rat brain. **Journal of Nutrition** 103: 1537-1547, 1973.

163.SIEGFRIED, B.; NETTO, C.A.; IZQUIERDO, I. Exposure to novelty induced naltrexone-reversible analgesia in rats. **Behavioral Neuroscience** 101: 436-439, 1987.

164.SILVA, M.T. Extiction of a passive avoidance response in adrenalectomized and demedullted rats. **Behavioral Biology** 9: 553-562, 1973.

165.SIMANTOV, R.; KUHAR, M.J.; UHL,G.R.; SNIDER, S.H. Opioid peptide enkephalin: imunohistochemical mapping in rat nervous system. **Proceeding National Academic Science, USA** 74: 2167-2171, 1977.

166.SLOB, A.K.; SNOW, C.F.; NATRIS-MATHOT, E. Absence of behavioral deficits following neonatal undernutrition in the rat. **Developmental Psychobiology** 6(2): 177-186, 1973.

167.SMART, J.L. Activity and exploratory behavior of adult offspring of undernourished mother rats. **Developmental Psychobiology** 7(4): 315-321, 1974.

168.SMART, J.L.; WHATSON, T.S.; DOBBING, J. Threshold of response to eletric shock in previously undernourished rats. **British Journal of Nutrition** 34: 511-516, 1975.

169.SOBOTKA, T.J.; COOK, M.P.; BRODIE, R.E. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. **Brain Research** 65: 443-457, 1974.

170.SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. Single classification analysis of variance (Chapter 9) and Assumptions of analysis of variance (Chapter 13). IN: **Biometry**, W.H. Freeman and Company, San Francisco, pp. 204-246 and pp. 367-403, 1969.

171.SOUZA, D.O. Estudo neuroquimico do aprendizado aversivo em ratos. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, 1980.

172.SPEAR, L.P.; ENTERS, E.K.; ASWAD, M.A.; LOUZAN, M. Drug and environmentally induced manipulations of the serotonergic systems alter nociception in neonatal rat pups. **Behavioral and Neural Biology** 44: 1-22, 1982.

173.SPEAR, L.P. & SCALZO, F.M. Ontogenetic alterations in the

effects of food and/or maternal deprivation on 5-HT, 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratios. **Developmental Brain Research** 18: 143-157, 1985.

174.STERN, W.C.; MILLER, M.; FORBES, W.B.; MORGANE, P.J.; RESNICK, O. Ontogeny of levels of biogenic amines in various parts of brain and in peripherical tissues in normal and protein malnourished rats. **Experimental Neurology** 49: 314-326, 1975.

175.STERN, W.C.; MORGANE, P.J.; MILLER, M.; RESNICK, O. Protein malnutrition in rats: response of brain amines and behavior to footshock stress. **Experimental Neurology** 47: 56-67, 1975.

176.STERN, W.C.; MILLER, M.; FORBES, W.B.; LEAHY, J.P.; MORGANE, P.J.; RESNICK, O. Effects of protein malnutrition during development on protein synthesis in brain and peripheral tissues. **Brain Research Bulletin** 1: 27-31, 1976.

177.SUBRAMANIAN, N.; MITZNEGG, P.; SPRUGEL, W.; DOMSCHKE, S.; WUNSCH, E.; DEMLING, L. Influence of enkephalin on K+ - evoked efflux of putative neurotransmitters in rat brain. **Archives of Pharmacology** 299: 163-165, 1977.

178.TRUBE, H.D.; BOROWSKI, E.; ENDO, T.; STARKE, K. Enkephalin: a potential modulator of noradrenaline release in the rat brain. **European Journal of Pharmacology** 38: 377-380, 1976.

179.TERENIUS, L. Characteristics of the receptor for narcotic analgesics in synaptic membrane fraction from rat brain. **Rota Pharmacology and Toxicology** 33: 377-384, 1973.

180.TERENIUS, L. Endogenous peptides and analgesia. **Annual Reviews Pharmacology Toxicology** 18: 189-204, 1978.

181.TSANG, D. & Nc, S.C. Development of radioimmunoassayble B-endorphin and methionine-enkephalin binding sites in regions of rat brain. **Canadian Journal Phisiology and Pharmacology** 58: 947-950, 1980.

182.TSENG, L.F.; LOH, H.H.; LI, C.H. B-endorphin as a potent analgesic by intravenous injection. **Nature** 263: 239-240, 1976.

183.TIGNER, J.C. & BARNES, R.H. Effect of posnatal malnutrition on plasma corticosteroid levels in male albino rats. **Proccedings of Society for Experimental Biology and Medicine** 149: 80-82, 1975.

184.VASWANI, K.K. & TEJWANI, G.A. Food deprivation-induced changes in the level of opioid peptides in the pituitary and brain of rat. **Life Science** 38: 197-201, 1985.

185.VON VOIGTLANDER, P.; LEWIS, R.; NEFF, G. Kappa opioid analgesia is dependent upon serotonergic mechanisms. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutic** 231: 270-274, 1984.

186.WALSH, R.N. & CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin** 83: 482-504, 1976.

187.WATERFIELD, A.A.; SMOCKUM, R.W.J.; HUGHES, J.; KOSTERLITZ, H.W.; HENDERSON, G. In vitro phamacology of the opioid peptides, enkephalins and endorphins. **European Journal of Pharmacology** 43: 107-116, 1977.

188.WEINER, S.G. & LEVINE, S. Perinatal malnutrition and early handling: Interative effects on the development of the pituitary-adreanal system. **Developmental Psychobiology** 11

(4): 335-352, 1978.

189.WIGGINS, R.C.; FULLER, G.; ENNR, S.J. Undernutrition and development of brain neurotransmitter system. **Life Science** 35: 2085-2094, 1984.

190.WINICK, M. Nutrition and nerve cell growth. **Federation Proceedings** 29 (4): 1510-1515, 1970.

191.WINICK, M. Malnutrition and mental development. IN: RLFIN-SLATER, R.B. & KRITCHEVSKY, D. eds. **Nutrition: pre- and posnatal development.** Plenum Press, New York. pp. 41-59, 1979

192.WINICK, M. & NOBLE, R. Quantitative changes in DNR, RNR, and protein during prenatal and posnatal growth in the rat. **Developmental Biology** 12: 451-466, 1965.

193.WINICK, M. & NOBLE, R. Cellular response in rats during malnutrition. **Journal of Nutrition** 89: 300-306, 1966.

194.ZRNDINR, J.E.; KRSTIN, R.J.; COY, D.H.; RDINOFF, B.R. Developmental, behavioral, and opiate receptor changes after prenatal or posnatal B-endorphin, CRF, or Tyr-MIF-1. **Psychoneuroendocrinology** 10: 367-383, 1985.

195.ZRKRRIRN, S. & SMITH, D. Distribution of active and inactive forms of endorphins in rat pituitary and brain. **Proceeding National Rcademic Science USR** 76 (11): 5972-5976, 1979.

196.ZRKRRIRN, S. & SMITH, D. B-endorphin is processed differently in specific regions of rat pituitary and brain. Nature 296: 250-252, 1982.

197.ZHRNG, R.Z. & PRSTERNRK, G.W. Ontogeny of opioid pharmacology and receptors: high and low affinity site differences. **European Journal of Pharmacology** 73: 29-40, 1981.

198.ZIELGLGANSBERGER, W. & BAYERL, H. The mechanism of inhibition of neuronal activity by opiates in the spinal cord of the cat. **Brain Research** 115: 11-128, 1976.

199.ZIEGLGANSBERGER, W.; FRENCH, E.; SIGGINS, G.R.; BLOOM, F.E. Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. **Science** 205: 415-417, 1979.

200.ZIMMERMANN, R.R. & ZIMMERMANN, S.J. Responses of protein malnourished rats to novel objects. **Perceptual and Motor Skills** 35: 319-321, 1972.