

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

Área de Concentração: Neurociências

**EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PRECOCE E DE CRISES
CONVULSIVAS NA MEMÓRIA ESPACIAL DO RATO
IMATURO**

Marta Hemb

Orientadora: Professora Dra Magda Lahorgue Nunes

Co-Orientador: Professor Dr Martín Pablo Cammarota

Porto Alegre, 2007

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

H487e **Hemb, Marta**

Efeitos da desnutrição precoce e de crises convulsivas na memória espacial do rato imaturo / Marta Hemb; orient. Magda Lahorgue Nunes; co-orient. Martin Pablo Cammarota. Porto Alegre: PUCRS, 2007.
54f.: gráf. il. tab.

Dissertação(Mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Neurociências.

1. DESNUTRIÇÃO. 2. EPILEPSIA. 3. CONVULSÕES. 4. ESTADO EPILÉPTICO. 5. MEMÓRIA. 6. PERCEPÇÃO ESPACIAL. 7. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. 8. ANIMAIS DE LABORATÓRIO. 9. RATOS. I. Nunes, Magda Lahorgue. II. Cammarota, Martin Pablo. III. Título.

C.D.D. 616.8
C.D.U. 159.953.2:591.52(043.3)
N.L.M. WL 103

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

Área de Concentração: Neurociências

**EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PRECOCE E DE CRISES
CONVULSIVAS NA MEMÓRIA ESPACIAL DO RATO
IMATURO.**

Marta Hemb

Orientadora: Professora Dra Magda Lahorgue Nunes

Co-Orientador: Professor Dr Martín Pablo Cammarota

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

Porto Alegre, 2007

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus amados pais, agradeço por tudo. Pela amizade, pelo amor, pelo apoio, pelo incentivo, pela confiança e por sempre apostarem em mim.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Magda Lahorgue Nunes pela sempre rica e incentivadora convivência durante meu crescimento profissional dentro desta universidade. Pelo suporte científico, pelo exemplo profissional, pelo incentivo, pela oportunidade e pela amizade e carinho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Martín Pablo Cammarota, pelo apoio, pelo suporte científico, pelo exemplo de conhecimento em pesquisa experimental e sobre tudo pela amizade, carinho e dedicação.

Ao Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa por disponibilizar e dirigir o Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUC-RS, assim como o serviço de neurologia desta mesma instituição, locais de inextinguível qualidade e referência em medicina.

Ao Prof. Dr. Ivan Izquierdo por disponibilizar o Centro de Memória do IPB PUC-RS e me receber sempre com muito carinho.

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

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

Ao meu querido colega Máurer Pereira Martins pela parceria e amizade.

Aos bolsistas Tomás Adam e Andréa Largura pela disponibilidade e ajuda durante a realização dos experimentos.

Às secretárias Sônia Mantovani, Nurma Pereira, Nelcy Arndt, Thais Carneiro e ao secretário Ernesto Amaral, pela disposição em sempre ajudar.

Ao Prof. Dr. Mário Wagner, pelos ensinamentos e auxílio na análise estatística.

À Giquitibá Moraes de Melo, pela disponibilidade de sempre e pelo profissionalismo na formatação deste trabalho.

Às bibliotecárias Jussára Albuquerque, Luzane Souto, Rosária Maria Lúcia Prena Geremia e Mara Hemb, minha querida mãe, na formatação da bibliografia desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Sérgio Amantéa, pelo incentivo, ajuda e amizade.

À Capes, por financiar minha pós-graduação.

À FAPERGS e ao CNPq, por financiarem o experimento.

Ao meu namorado Pedro, pela paciência, companheirismo e compreensão.

Ao meu irmão Pedro, pela amizade e amor.

À minha família, pelo incentivo constante.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 DESNUTRIÇÃO.....	3
2.1.1 A influência da desnutrição no desenvolvimento cerebral.....	4
2.1.2 Alterações cerebrais secundárias à desnutrição.....	5
2.2 CRISES CONVULSIVAS E EPILEPSIA	6
2.2.1 Crises convulsivas e o desenvolvimento cerebral	8
2.2.2 Alterações decorrentes de crises convulsivas recorrentes e do status epilepticus no cérebro em desenvolvimento.....	9
2.3 MEMÓRIA.....	11
2.4 DESNUTRIÇÃO E MEMÓRIA	13
2.5 EPILEPSIA E MEMÓRIA.....	14
2.6 DESNUTRIÇÃO, EPILEPSIA E MEMÓRIA.....	16
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 GERAL.....	19
3.2. ESPECÍFICOS.....	19
4 METODOLOGIA.....	20
4.1 PARADIGMA DA DESNUTRIÇÃO.....	21
4.2 CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR FLUROTHYL	22
4.3 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS (LAM).....	23
4.3.1 Aprendizado espacial no Labirinto Aquático de Morris	26
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4.5 CÁLCULO AMOSTRAL	27

5 ASPECTOS ÉTICOS	28
6 RESULTADOS	29
6.1. EFEITO DA DESNUTRIÇÃO E DAS CRISES CONVULSIVAS NO PESO CORPORAL.....	29
6.2 EFEITO DA DESNUTRIÇÃO E DAS CRISES CONVULSIVAS NO PESO CEREBRAL	30
6.3 EFEITO DO ESTADO NUTRICIONAL NO LIMIAR PARA CRISE CONVULSIVA	32
6.4 EFEITO DA DESNUTRIÇÃO E DAS CRISES CONVULSIVAS NO APRENDIZADO E MEMÓRIA ESPACIAIS.....	33
7 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	36
8 CONCLUSÕES	40
9 PERSPECTIVAS	42
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

CA	cornu de Amon
DC	Desnutridos Controles,
DCR	Desnutridos Crises Recorrentes
DSE	Desnutridos <i>Status Epilepticus</i>
E.P	erro-padrão
g	gramas
GABA	acido gama amino butírico
GD	giro denteado
h	hora
i.e	isto é
i.p	intraperitoneal
LAM	labirinto aquático de Morris
LTP	long term potentiation ou potenciação de longa duração
m	metro
min	minutos
ml	mililitros
NS	Nutridos Controles
NCR	Nutridos Crises Recorrentes
NSE	Nutridos <i>Status Epilepticus</i>
P	dia pós- natal
PC	perímetro cefálico
PUC-RS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
QI	quociente intelectual
s	segundos
SNC	sistema nervoso central
UTI	unidade de terapia intensiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Comparação dos tamanhos de um rato nutrido e um desnutrido da mesma idade.	21
Figura 2.	Equipamento utilizado na aplicação da técnica do flurothyl.....	22
Figura 3.	Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.....	24
Figura 4.	Cilindro utilizado para limitar o tamanho da piscina do LAM	24
Figura 5.	Esquema representativo do LAM (I).....	25
Figura 6.	Esquema representativo do LAM (II).....	25
Figura 7.	Comparação do ganho de peso corporal entre os grupos Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos), Nutrido Controle (NC), Nutrido Crise Recorrente (NCR), Nutrido Status Epilepticus (NSE), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos), Desnutrido Controle (UC), Desnutrido Crise Recorrente (DCR) e Desnutrido Status Epilepticus (DSE) , entre P2 e P15, em ratos Wistar.....	30
Figura 8.	Comparação do peso cerebral entre os grupos Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos), Nutrido Controle (NC), Nutrido Crise Recorrente (NCR), Nutrido Status Epilepticus (NSE), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos), Desnutrido Controle (UC), Desnutrido Crise Recorrente (DCR) e Desnutrido Status Epilepticus (DSE) , em P30, em ratos Wistar.....	31
Figura 9-	Comparação de limiar convulsivo do Flurothyl entre os animais que sofreram <i>status epilepticus</i> (grupos NSE e DSE), em P15, de acordo com o estado nutricional, em ratos Wistar.....	32
Figura 10.	Comparação da performance no labirinto aquático de Morris entre os grupos Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos), Nutrido Controle (NC), Nutrido Crise Recorrente (NCR), Nutrido Status Epilepticus (NSE), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos), Desnutrido Controle (UC), Desnutrido Crise Recorrente (DCR) e Desnutrido Status Epilepticus (DSE).	35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Comparação do ganho de peso (g) observado entre o dia 2 e dia 15 segundo o tipo de crise convulsiva e a desnutrição em ratos Wistar 29
- Tabela 2. Comparação do peso cerebral (g) observado no dia 30 segundo o tipo de crise convulsiva e a desnutrição em ratos Wistar..... 31
- Tabela 3. Comparação do limiar para SE (s) observado no 15 dia de vida segundo a desnutrição em ratos Wistar 32
- Tabela 4 (A). Comparação da latência de chegada à plataforma oculta (s) observado entre os dias 1 e 5 (testes de aquisição) do LAM segundo o dia, o tipo de crise convulsiva e a desnutrição em ratos Wistar..... 34
- Tabela 4 (B). Comparação do tempo no Quadrante Alvo (QA) (%) observada no teste de prova do LAM segundo o tipo de crise convulsiva e a desnutrição em ratos Wistar..... 34

RESUMO

Objetivo: Neste estudo foram avaliados os efeitos da desnutrição precoce e de crises convulsivas no aprendizado espacial e na memória, em um modelo de desenvolvimento cerebral.

Métodos: Filhotes machos de ratos Wistar foram alocados em seis grupos: Nutridos Controles (NC), Nutridos Crises Recorrentes (NCR), Nutridos *Status Epilepticus* (NSE), Desnutridos Controles (DC), Desnutridos Crises Recorrentes (DCR) e Desnutridos *Status Epilepticus* (DSE). Os animais dos grupos DC, DCR e DSE foram mantidos em um regime de privação alimentar do segundo (P2) ao décimo quinto (P15) dia de vida pós-natal. De P2 a P4, os grupos NCR e DCR foram expostos a três crises convulsivas recorrentes por dia, induzidas por flurothyl. Em P15, os grupos NSE e DSE foram expostos a um *status epilepticus* induzido por esta mesma substância. De P21 à 26 todos os grupos foram testados no labirinto aquático de Morris para aferição do aprendizado e memória espaciais. Em P30, os animais foram sacrificados e os cérebros foram pesados.

Resultados: A análise indicou que a desnutrição precoce não alterou a suscetibilidade às crises convulsivas em P15 mas reduziu os pesos corporais e cerebrais ($p < 0,001$), enquanto as crises convulsivas diminuíram o peso corporal ($p < 0,01$), mas não o cerebral ($p = 0,972$). Além disto, os animais desnutridos permaneceram menos tempo no quadrante alvo do labirinto aquático de Morris do que os nutridos, durante o teste de prova, em P26 ($p < 0,001$). Da mesma forma, os ratos submetidos às crises recorrentes, assim como os que sofreram *status epilepticus*, também permaneceram menos tempo no quadrante alvo, quando comparados aos animais livres de crises ($p = 0,001$).

Conclusão: Nossos achados mostram que a desnutrição e as crises convulsivas apresentam um efeito aditivo prejudicial no peso corporal, no peso cerebral e na retenção da memória espacial de ratos jovens.

Descritores: desnutrição, epilepsia, crises convulsivas, *status epilepticus*, memória

ABSTRACT

Purpose: In this study we evaluated the effects of undernourishment and seizures on memory and spatial learning in a model of developing brain.

Methods: Male Wistar pup rats were allocated to one out of six experimental groups as follows: Nourished Control (NC), Nourished Recurrent Seizures (NRS), Nourished *Status Epilepticus* (NSE), Undernourished Control (UC), Undernourished Recurrent Seizures (URS) or Undernourished *Status Epilepticus* (USE). UC, URS and USE groups were maintained on a starvation regimen from post-natal day 2 (P2) to post-natal day 15 (P15). URS and NRS groups suffered three daily flurothyl-induced seizures from P2 to P4. USE and NSE groups suffered a *status epilepticus* (SE) at P15. Beginning at P21 all groups were trained in the Morris water maze. At P30 the animals were sacrificed and their brains weighted.

Results: Our data indicate that early undernourishment does not alter seizure susceptibility at P15, but diminishes body and brain weight ($p < 0,001$), whereas seizures diminish body ($p < 0,001$) but not brain weight ($p = 0,972$). In the Morris water probe test we have observed that undernourished rats spent less time in the target quadrant than nourished animals ($p < 0,001$). Also, rats submitted to recurrent seizures and rats submitted to *status epilepticus* spent less time in the target quadrant than seizure-free animals ($p = 0,001$). There was a significant interaction between undernourishment and seizure ($p = 0,013$).

Discussion: Our findings show that undernourishment and seizures have a detrimental additive effect on body and brain weight as well as in spatial memory.

Keywords: undernourishment, epilepsy, seizures, memory, developing brain

1 INTRODUÇÃO

O pesquisador, como homem de ciência, tem como objetivo maior a busca da verdade através dos fatos objetivos inerentes ao seu trabalho. Historicamente, é possível verificar enormes avanços obtidos no que concerne ao uso de animais em experimentos. Os modelos animais são uns dos principais alicerces do progresso da Medicina. Os experimentos devem visar novas descobertas ou conhecimentos de fisiologia e serem úteis para salvar ou prolongar a vida e aliviar sofrimentos. Assim, os estudos em animais são considerados uma etapa importante para a pesquisa na área da saúde.

Desnutrição e epilepsia são condições prevalentes nos países do terceiro mundo, sendo uma relação causa-efeito muitas vezes proposta. Durante a infância, podem ser responsáveis por sérias alterações fisiológicas e morfológicas no cérebro em desenvolvimento, acarretando danos cognitivos importantes.

Existem poucos desenhos experimentais avaliando desnutrição, epilepsia e memória. Quando pesquisamos isoladamente, tanto desnutrição, quanto epilepsia, encontramos um número expressivo de artigos relatando um declínio cognitivo secundário a estas condições. Porém, quando investigamos desnutrição e epilepsia juntas, poucos estudos avaliam esta interação e conseqüente associação com prejuízo na memória.

Estudos clínicos em crianças desnutridas apontam que elas apresentam mais problemas de aprendizado, memória e comportamento. Em ratos, a desnutrição também acarreta alterações cognitivas significativas e conseqüente prejuízo na memória espacial.

Ainda questiona-se ser a desnutrição uma causa direta de epilepsia, ou não. O que sabe-se, porém, é que ela é capaz de diminuir o limiar convulsivo em modelos experimentais.

Assim como pesquisas clínicas e experimentais mostram ser a desnutrição responsável por alterações cognitivas e comportamentais, as crises convulsivas também

são capazes de acarretar uma variedade de efeitos colaterais na memória e no comportamento.

Por morarmos no Brasil, direcionamos nosso estudo para um tópico importante e decidimos explorar a interação entre desnutrição e epilepsia, assim como suas conseqüências no animal imaturo, principalmente no que diz respeito à memória espacial.

Ponderando a relevância epidemiológica da desnutrição e da epilepsia e considerando a alta prevalência destas condições nas crianças que habitam países em desenvolvimento, decidimos avaliar se a desnutrição e a epilepsia interagem e se são capazes de modificar o crescimento cerebral.

Utilizamos filhotes machos de ratos Wistar, com o objetivo de avaliarmos os efeitos da privação alimentar na suscetibilidade às crises convulsivas, nos pesos corporais e cerebrais, assim como na aquisição e retenção da memória espacial, após crises recorrentes precoces e indução de *status epilepticus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DESNUTRIÇÃO

A desnutrição, conforme definição da Organização Mundial da Saúde, é uma variedade de condições patológicas, decorrentes de deficiências de energia e proteínas, em variadas proporções, que atinge preferencialmente as crianças. A desnutrição protéico-energética é um estágio de carência de calorias e outros nutrientes no qual o organismo apresenta desaceleração (casos leves), interrupção (casos moderados) ou involução (casos graves) de sua evolução normal de crescimento e desenvolvimento (Mello, 2005).

Sabe-se que a desnutrição humana é composta de aspectos biológicos, psicológicos e sociológicos. As várias práticas comportamentais associadas à desnutrição tendem a passar de uma geração para outra perpetuando esta condição e dificultando sua resolução.

Globalmente, a pobreza é maior causa indireta de desnutrição, que, por sua vez, é causa direta de aproximadamente 300 mil óbitos por ano. No mundo, 852 milhões de pessoas são desnutridas sendo que 95% vivem em países em desenvolvimento (Muller & Krawinkel, 2005).

Mais de 10 milhões de crianças menores de 5 anos morrem a cada ano, e destas, 1,5 milhões sofrem de desnutrição severa (Collins et al., 2006). Pelletier et al (Pelletier et al., 1994) mostraram que de 53 a 60% das mortes infantis mundiais são atribuídas à desnutrição. Uma entre quatro crianças em idade pré-escolar sofre de desnutrição, o que pode afetar seriamente o seu desenvolvimento físico e mental (WHO, 2001)

No Brasil, a desnutrição é a principal causa de morbimortalidade em crianças menores de 5 anos.

A desnutrição, na fase inicial da vida, quando ocorre o período crítico de crescimento e desenvolvimento, pode gerar danos irreparáveis. Danos estes, muitas vezes irreversíveis mesmo com reabilitação nutricional adequada (Dobbing & Sands, 1979).

2.1.1 A influência da desnutrição no desenvolvimento cerebral

O impacto da desnutrição no desenvolvimento cerebral deve ser analisado no contexto da fase em que o processo patológico teve início e de quando atingiu sua atividade máxima. O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) ocorre em etapas que seguem uma seqüência precisa que é diferente nas diversas regiões cerebrais e que varia no tempo, de uma espécie de animal para outra. Esta consideração é importante devido ao uso de modelos animais para avaliar os processos cerebrais afetados pela desnutrição (Morgane et al., 2002). A seqüência essencial dos processos de desenvolvimento cerebral, isto é, o cronograma de desenvolvimento genotipicamente ordenado, fundamentalmente não varia entre os mamíferos (Rodier, 1980).

Está bem estabelecido o fato de que os efeitos da desnutrição na estrutura e função neural são mais severos quando a deficiência nutricional ocorre durante o pico de crescimento cerebral. No rato, este período corresponde às primeiras 3 semanas de vida pós-natal, o período de lactação, época em que o cérebro apresenta máxima vulnerabilidade para vários tipos de insultos, incluindo a desnutrição (Costa-Cruz et al., 2006).

Durante o primeiro ano de vida, a desnutrição afeta o crescimento corporal e cerebral, mas pelo fato do crescimento corporal humano ocorrer até aproximadamente os 18 anos de idade, pode existir uma recuperação da altura através de uma posterior alimentação adequada. Todavia, isto não acontece com o cérebro, pois como os primeiros anos de vida representam o período de máximo crescimento cerebral, 70% do peso do cérebro adulto já foi atingido ao fim do primeiro ano de vida (Ivanovic, 1996; Stoch et al., 1982).

A avaliação do perímetro cefálico (PC) é uma das medidas mais importantes, realizada durante o exame do recém-nascido e da criança, por ser um preditor do desenvolvimento neurológico (Bolduc & Shevell, 2005). Achados de alguns estudos enfatizam que o PC é o dado antropométrico que mais reflete o impacto das deficiências

nutricionais em uma fase precoce da vida (Leiva et al., 2001; Malina et al., 1975). A diminuição do PC é proporcional à redução do peso cerebral e é um indicador real da severidade da deficiência nutricional (Winick, 1969; Winick & Rosso, 1969 a,b).

2.1.2 Alterações cerebrais secundárias à desnutrição

Alguns estudos apontam uma diminuição nas taxas de divisão celular resultando em uma diminuição da mielinização, do peso cerebral e do seu conteúdo de ácidos nucléicos e proteínas, em crianças que morreram de desnutrição em idade precoce (Winick & Rosso, 1969 a,b). Cravioto e Milan (Cravioto & Milan, 1989), estudando crianças desnutridas durante o primeiro ano de vida, constataram que aquelas que apresentavam baixo peso ao nascer apresentavam uma redução de 60% das células nervosas cerebrais.

Experimentalmente, a restrição nutricional durante a gestação afeta o crescimento do corpo caloso, causa assimetria cerebral e reduz o peso cerebral (Soto-Moyano et al., 1993), além de acarretar alterações bioquímicas no SNC, especialmente sobre os neurotransmissores (Rotta et al., 2003; Steiger et al., 2002). A desnutrição aumenta a concentração de triptofano, um precursor da serotonina; reduz a concentração de acetilcolina e de ácido-glutâmico descarboxilase, a enzima sintetizadora do ácido gama aminobutírico (GABA); e diminui o número de receptores dopaminérgicos estriatais (Wiggins et al., 1984).

Alterações histológicas secundárias à desnutrição, como diminuição da densidade de células neuronais e gliais no córtex cerebral e cerebelar (Dobbing & Hopewell, 1971), e diminuição das espinhas dendríticas no córtex cingulado, são alguns dos achados em ratos desnutridos (Garcia-Ruiz et al., 1993; Schonheit & Haensel, 1984). Nos animais com deficiências nutricionais, o córtex apresenta mais de 40% de perda das sinapses (Morgane et al., 1985) e redução no seu volume (Dobbing et al., 1971; Leuba & Rabinowics, 1979a), o que explica o prejuízo na transmissão de informações, uma vez que a quantidade de neurotransmissores está diminuída (Dyson & Jones, 1976).

Estudos neuro-anatômicos apontam o hipocampo como uma das regiões cerebrais mais atingidas pela desnutrição. Os efeitos observados incluem uma redução significativa do tamanho das células do giro denteado (GD), assim como, uma redução nos ramos e espinhas dendríticas de seus neurônios piramidais (Garcia-Ruiz et al., 1993; Levitsky &

Strupp, 1995; Schonheit & Haensel, 1984). Além disso, evidências indicam que as sinapses do cérebro desnutrido são menos plásticas. A diminuição da plasticidade é um dos resultados do aumento dos neurotransmissores inibitórios, e é considerada a principal patologia hipocampal associada à desnutrição (Morgane et al., 2002).

2.2 CRISES CONVULSIVAS E EPILEPSIA

Crise convulsiva é uma súbita descarga elétrica nos neurônios do SNC, capaz de alterar um comportamento ou função, e epilepsia são duas ou mais crises não provocadas (Fernandes & Sander, 1998).

As crises convulsivas podem variar de pequenos lapsos de atenção ou abalos musculares a convulsões severas e prolongadas, e até mesmo, a um *status epilepticus*. O *status epilepticus* é representado por crises freqüentes, sem recuperação da consciência entre as mesmas, ou crise única com duração superior a 30 minutos (Epilepsy Foundation of America's Working Group on Status Epilepticus, 1993). As crises convulsivas também podem variar em freqüência, de menos do que uma por ano até várias por dia. As crises convulsivas podem ser classificadas de acordo com seu local de origem no cérebro em parciais ou focais, quando surgem a partir de uma descarga elétrica de uma ou mais áreas localizadas (sendo chamadas de complexas, quando alteram a consciência); e generalizadas, quando a descarga elétrica envolve o cérebro como um todo. O tipo mais freqüente de epilepsia, segundo dados globais, é composto por crises parciais complexas, oriundas, na grande maioria das vezes, das estruturas do lobo temporal, como hipocampo e amígdala (Losher, 1997).

Não esta clara a razão de certas crises ocorrerem em certas idades ou épocas. As diferentes síndromes epilépticas são baseadas na idade de início, tipo de crise, presença ou ausência de doença cerebral e alterações genéticas.

A epilepsia não apresenta limites geográficos, raciais ou sociais. Ocorre em homens e mulheres e pode iniciar em qualquer faixa etária, mas é mais freqüentemente diagnosticada na infância, adolescência e velhice. Qualquer pessoa pode vir a apresentar uma crise epiléptica. De fato, mais de 5% da população mundial apresenta uma crise única em algum momento de sua vida, sendo que o diagnóstico de epilepsia, como visto

anteriormente, é reservado para aqueles que apresentam crises recorrentes, ao menos duas, não provocadas (WHO, 2001)

No mundo, por ano, a incidência de epilepsia varia de 30 a 50 pessoas por 100.000 habitantes, e sua prevalência é de 5 a 9 pessoas por 1.000 habitantes (Logroscino et al., 2001). Todavia, esta pode ser uma sub-estimativa, visto que alguns estudos em países em desenvolvimento sugerem uma incidência anual de aproximadamente 100 pessoas por 100.000 habitantes por ano, e uma prevalência de mais de 10 pessoas por 1.000 habitantes (WHO, 2001).

Em uma revisão sistemática da incidência e prevalência de epilepsia na América Latina, Burneo et al. (Burneo et al., 2005) encontraram uma prevalência de 17,8 pessoas por 1.000 habitantes, e uma incidência de 77,7 a 190 pessoas por 100.000 habitantes por ano.

No Brasil, a prevalência de epilepsia é de aproximadamente 12 pessoas por 1.000 habitantes (Guerreiro et al., 2000). Borges et al (Borges et al., 2004), verificaram a prevalência urbana de epilepsia na cidade de São José do Rio Preto, estado de São Paulo. A amostra estudada foi de 17.293 pessoas, cuja distribuição quanto ao sexo, à faixa etária e à raça foi semelhante à da população geral. A prevalência de epilepsia por 1.000 habitantes foi 18,6 pessoas, sendo 8,2 pessoas para doença ativa considerando-se, pelo menos, uma crise no período dos últimos 2 anos. Na cidade de Porto Alegre, esta prevalência é de 16,5 pessoas por 1.000 habitantes (Fernandes, 1993).

Universalmente, é estimado que 10,5 milhões de crianças menores de 15 anos apresentem epilepsia ativa, representando 25% da população global com epilepsia. Dos 3,5 milhões de pessoas que desenvolvem epilepsia anualmente, 40% são menores de 15 anos e mais do que 80% vivem em países em desenvolvimento. Estudos populacionais sobre epilepsia no início na infância apontam valores de incidência anuais de 61 a 124 crianças por 100.000 habitantes por ano, em países em desenvolvimento e de 41 a 50 crianças por 100.000 habitantes por ano, em países desenvolvidos. Valores de prevalência de epilepsia infantil na Europa e América do Norte variam de 3,6 a 6,5 crianças por 1.000 habitantes, enquanto na África e América Latina variam de 6,6 a 17 crianças por 1.000 habitantes (Forsgren, 2004). Embora as crises epiléticas possam ocorrer em qualquer idade, elas constituem uma situação patológica do jovem: até os 20 anos de idade, 90% dos indivíduos que serão epiléticos já iniciaram suas crises; entre as crianças, 60% tiveram a sua primeira

crise até os três anos, sendo que a maior parte ocorreu no primeiro ano de vida (Aicardi, 1988).

Existem evidências de que, crises prolongadas em um cérebro em fase de maturação, aumentam o risco de crises convulsivas subseqüentes e epilepsia (Nunes et al., 2000). Silva et al (Silva et al., 2004), avaliaram 158 crianças que apresentaram duas ou mais crises convulsivas. A percentagem de epilepsia após crises neonatais nestas crianças foi de 22% em 12 meses e de 33,8% em 48 meses de seguimento. A ocorrência de epilepsia após crises neonatais varia em freqüência, de 3,5 a 56%, como mostram vários estudos (Clancy & Legido, 1991; Mizhari & Kellaway, 1987). As crises convulsivas permanecem nas manifestações clínicas secundárias aos insultos neurológicos mais importantes no período neonatal (Lombroso, 1983; Scher & Painter, 1989), ocorrendo entre 0,2 e 1,4% dos casos (Aicardi, 1988; Lombroso et al., 1998). Existe uma estreita associação entre estas crises e o desenvolvimento de deficiências neurológicas permanentes (Bernes & Kaplan, 1994; Lombroso, 1996; Scher, 1997), estando a epilepsia pós-natal incluída entre as mesmas (Silva et al., 2004). Moshé e Albala (Moshé & Albala, 1983), avaliaram as alterações maturacionais na refratariedade pós-ictal e a suscetibilidade às crises convulsivas em ratos jovens e concluíram que a probabilidade de desenvolver crises na idade adulta está diretamente relacionada com a história de crises na infância.

2.2.1 Crises convulsivas e o desenvolvimento cerebral

É sabido que o cérebro humano imaturo está mais predisposto a gerar crises convulsivas do que o maduro (Aicardi, 1988). Esta predisposição pode ser explicada através de diversos fatores que são característicos do período neonatal, entre eles, o rápido crescimento e desenvolvimento do SNC, pois o processo ontogenético de transformação de SNC imaturo em maduro talvez torne esta estrutura mais vulnerável a insultos exógenos (Mizhari, 1999); o predomínio dos sistemas excitatórios em relação aos inibitórios, facilitando a ocorrência da manifestação convulsiva (Moshé, 1993); o fato dos neurotransmissores inibitórios do SNC maduro apresentarem atividade excitatória no SNC imaturo (Cherubini et al., 1991); a facilidade existente na propagação da atividade epileptogênica no cérebro imaturo por ausência de fatores inibitórios (Prince & Wilder, 1967); entre outros (Costa et al., 2001; Moshé & Sperber, 1998).

A atividade epiléptica, quando em idade precoce, pode interferir de maneira significativa no crescimento cerebral e desenvolvimento infantil (Rener-Primec et al., 2006). O PC de uma criança apresenta relação direta com o crescimento do cérebro refletindo seu peso, volume, crescimento celular e conteúdo protéico (Amiel-Tison et al., 2002; Winick & Rosso, 1969a,b). Estudos de imagem em crianças com epilepsia revelam uma redução do volume cerebral nas mesmas (Specht et al., 1997). Liu et al (Liu et al., 2005), relataram que a diminuição do volume cerebral total secundária à epilepsia é o resultado do dano precipitante inicial somado à atrofia cerebral relacionada à idade. Sabe-se que existe uma relação direta entre atividade convulsiva e redução de volume cerebral, tanto em adultos, quanto na população infantil (Liu et al., 2005). Bolduc e Shevell (Bolduc & Shevell, 2005), avaliando o perímetro cefálico de sobreviventes de uma unidade de terapia intensiva (UTI) neonatal, como preditor do desempenho no desenvolvimento, notaram que o fato de apresentar epilepsia estava relacionado a uma redução do PC, assim como às deficiências no desenvolvimento físico e mental destas crianças. Em 1976, ao avaliar o peso cerebral de ratos submetidos a *status epilepticus* por flurothyl, Wasterlain (Wasterlain, 1976b), apontou a redução do mesmo após crises convulsivas. Outros autores, em estudos experimentais mais atuais, também mostraram diminuição do peso cerebral após indução de crises convulsivas. (Narismägi et al., 2006; White, 2002).

2.2.2 Alterações decorrentes de crises convulsivas recorrentes e do status epilepticus no cérebro em desenvolvimento

As crises convulsivas, particularmente quando prolongadas ou freqüentes, estão associadas com uma variedade de desfechos adversos. Neurologistas estão cada vez mais interessados em saber quais os efeitos agudos e crônicos, tanto de crises convulsivas recorrentes e breves, como de crises prolongadas, no cérebro humano. Estas questões são de interesse clínico imediato no julgamento de quão agressivo devem ser os tratamentos destas crises e na determinação de seus prognósticos.

Nos mamíferos, o hipocampo é a estrutura cerebral que apresenta o menor limiar convulsivo (Abdelmalik et al., 2005) e no homem adulto, é o local mais freqüente de foco epiléptico (Engel & Pedley, 1998). Como veremos, diferentes tipos de estudos indicam que crises longas e severas no adulto, como o *status epilepticus*, resultam em alterações hipocampais. Crises mais amenas, por sua vez, podem acarretar alterações funcionais ou

até mesmo alterar a conectividade sináptica sem que o dano neuronal seja tão extenso. Dados experimentais indicam que o cérebro imaturo está mais protegido do que o maduro em relação tanto às crises prolongadas, quanto às crises convulsivas breves, no entanto, a longo prazo, alterações funcionais podem ocorrer (Haut et al., 2004; Lado et al., 2002). Em animais adultos, o *status epilepticus* provoca perda neuronal nas regiões do corno de Amon 1 e 3 (CA1 e CA3) e GD do hipocampo, além de acarretar proliferação aberrante dos axônios das células granulares (as chamadas fibras musgosas) na zona de CA3 e aumentar a neurogênese neste local (Ben-Ari, 1985; Represa et al., 1994). Embora não tão dramática quanto a perda celular após o *status epilepticus*, existem evidências de que crises recorrentes breves causem injúria semelhante no cérebro dos animais (Cavazos & Sutula, 1990; Golarai et al., 1992).

Os neurônios em desenvolvimento são menos vulneráveis do que os neurônios adultos à uma ampla variedade de insultos neurológicos, como dano neuronal e perda celular. Eles são mais resistentes a longos episódios de anóxia (Cherubini et al., 1989) e aos efeitos tóxicos do glutamato, entre outros exemplos (Liu et al., 1996). Além disso, animais imaturos são menos propensos do que os maduros à perda celular hipocampal depois de uma crise convulsiva prolongada (Berger et al., 1984; Sankar et al., 1998), assim como o brotamento das fibras musgosas é menos proeminente nos mesmos (Yang et al., 1998). Nunes et al (Nunes et al., 2000), assim como Sperber et al (Sperber et al., 1999), estudando o papel do *status epilepticus* no hipocampo imaturo, notaram que o mesmo não produz nenhuma perda celular aparente ou degeneração celular aguda nesta região. Os primeiros autores (Nunes et al., 2000), porém, reportaram que o *status epilepticus* aumenta a neurogênese no giro denteado anterior do hipocampo, uma observação semelhante a de Parent et al (Parent et al., 1997).

No animal jovem, crises recorrentes e breves durante as primeiras semanas de vida não resultam em perda celular, mas estão associadas a um extenso brotamento de fibras musgosas em região CA3 do hipocampo (Rivello et al., 2002), assim como a um aumento da neurogênese no GD (Neill et al., 1996; McCabe et al., 2001), apesar de já existirem estudos mostrando diminuição desta neurogênese (McCabe et al., 2001; Parent et al., 1998).

2.3 MEMÓRIA

Durante todo o século XX, muitos investigadores tentaram estabelecer as bases biológicas da inteligência humana. Os achados destes estudos demonstraram que as variações no tamanho cerebral estão relacionadas com a inteligência (Botting et al., 1998; Ivanovic et al., 2000). Valores de PC abaixo do normal, estão associados com habilidades intelectuais pobres. Desta forma, pequenas diferenças no tamanho craniano podem ser significativas na inter-relação entre volume cerebral, inteligência, aprendizado e memória (Ivanovic et al., 2000).

A inteligência é o termo usado no discurso comum para se referir à habilidade cognitiva que, por sua vez, é o ato ou processo de conhecer, envolvendo a atenção, percepção, raciocínio, juízo, imaginação, pensamento, linguagem, aprendizado e memória. O aprendizado é o processo pelo qual obtemos conhecimento do mundo, enquanto que a memória é o processo pelo qual este conhecimento é estocado e mais tarde recuperado (Kandel et al., 1991).

Memória é a aquisição, formação, conservação e evocação de informações. O conjunto de memórias de cada um determina aquilo que se denomina personalidade (Izquierdo, 2002).

A memória do homem é semelhante a dos outros mamíferos no que concerne aos seus mecanismos essenciais, às áreas nervosas envolvidas e seu mecanismo molecular de operação, mas não no que se refere ao seu conteúdo (Izquierdo, 2002).

Podemos dividir as memórias, de acordo com a função, em memória de trabalho, declarativa ou explícita, e procedural ou implícita. A memória de trabalho é aquela que mantém em nível consciente, por segundos ou minutos, informações recentes ou antigas que necessitam ser recordadas naquele momento para a realização de uma tarefa ou a tomada de uma decisão (Baddeley, 2000). Denominam-se memórias declarativas ou explícitas os registros de eventos, fatos e conhecimentos semânticos. Estas são informações que podem ser trazidas ao plano consciente. As memórias declarativas dividem-se em episódicas e semânticas referindo-se, respectivamente, aos acontecimentos passados na biografia de um indivíduo e aos conhecimentos gerais do significado das coisas, adquiridos no decorrer da vida. A memória declarativa necessita de um bom funcionamento do córtex entorrinal, córtex parietal, *subiculum*, hipocampo e amígdala. Por

fim, a memória procedural ou implícita, que envolve habilidades motoras e sensoriais dependentes da substância *nigra* e do cerebelo (Izquierdo, 2002).

Quanto ao tempo de duração, dividimos a memória em: de curta duração, aquela que dura até 6 horas (ou o tempo necessário para que a memória de longa duração se consolide); de longa duração, que dura mais de 6 horas; e remota, a memória que dura por décadas. As diferenças entre as memórias de curta e longa duração residem não em seu conteúdo cognitivo, que é o mesmo, mas sim nos mecanismos subjacentes a cada uma delas. As diferenças indicam claramente que estas duas memórias não são partes de um mesmo processo, mas sim duas séries de processos paralelos e independentes (Izquierdo, 2002). As memórias declarativas de longa duração levam tempo para consolidarem. Nas primeiras horas após sua aquisição são lábeis e suscetíveis a interferências de diversos fatores (Izquierdo, 1989; McGaugh, 2000).

A formação de uma memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras regiões cerebrais (Izquierdo & Medina, 1997). O conjunto destes processos e seu resultado final denominam-se consolidação. Há consenso entre diversos pesquisadores, que as memórias consistem na modificação de determinadas sinapses de distintas vias, que incluem o hipocampo e suas principais conexões (Izquierdo, 2002).

O cérebro dos humanos é flexível, permitindo alterações de funções e estruturas em resposta aos estímulos internos e externos. Este tipo de flexibilidade pode ser chamado de plasticidade neuronal. A plasticidade neuronal dos animais é essencial nas suas vidas diárias para que possam se adaptar a alterações do ambiente externo (Myiamoto, 2006).

Em 1973, Bliss e Lomo (Bliss & Lomo, 1973), observaram que a estimulação tetânica da via perfurante das fibras pré-sinápticas resultava em altas respostas das células granulares dos neurônios pós-sinápticos. Os experimentos foram conduzidos *in vivo* com coelhos. Eles chamaram o efeito de potenciação de longa duração (LTP), porque a elevação do potencial pós-sináptico continuou por um longo tempo. A LTP é uma forma de plasticidade sináptica que tem fundamentado o mecanismo neural do aprendizado e estocagem de memória no cérebro (Rogan & Ledoux, 1995). Alguns estudos envolvendo avaliação comportamental de animais encontraram alta correlação entre memória espacial e LTP (Deupree, 1993; Moore et al., 1993).

2.4 DESNUTRIÇÃO E MEMÓRIA

A desnutrição é um problema mundial que afeta milhões de crianças durante os estágios mais vulneráveis do desenvolvimento cerebral. As crianças desnutridas apresentam deficiências em seu sistema imunológico e maior risco de infecções, além de maior predisposição ao atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (Dobbing et al., 1971). A desnutrição é responsável pela alteração de vários eventos maturacionais centrais resultando em anormalidades comportamentais, piora do funcionamento cognitivo e distúrbios no aprendizado e memória. Os efeitos dos insultos nutricionais no cérebro em desenvolvimento são duradouros e levam a deficiências permanentes no aprendizado e comportamento. Existem estudos mostrando prejuízo cognitivo secundário à desnutrição pré e pós-natal (Morgane et al., 1993) .

A maturação do SNC e o desenvolvimento de uma inteligência adequada dependem de três fatores críticos: diretrizes inatas ou genéticas, estímulo ambiental e nutrição adequada. Alterações no desenvolvimento cerebral pré-natal decorrente de quaisquer alterações destes fatores podem resultar em vários graus de prejuízo comportamental e disfunção cerebral. Atualmente, sabe-se que o contribuinte não genético mais importante para alterações permanentes do desenvolvimento cerebral fetal é a deficiência nutricional (Galler, 2001; Morgane et al., 2002). Especificamente na população pediátrica, a desnutrição é um problema sério. A privação alimentar nesta fase pode prejudicar o desenvolvimento mental e intelectual pela produção de um dano estrutural irreversível no cérebro (Brown & Pollitt, 1996). Alguns dos efeitos, em longo prazo, de uma privação alimentar precoce são: crescimento cefálico aquém do esperado, atraso no desenvolvimento cerebral, diminuição na inteligência e menor sucesso escolar (Ivanovic et al., 2000; Stoch et al., 1982).

O PC, como indicador de passado nutricional e desenvolvimento cerebral, é considerado o parâmetro antropométrico mais fidedigno da habilidade intelectual. A associação de um PC diminuído com o prejuízo do funcionamento viso-motor é o indicador mais confiável de uma desvantagem cognitiva secundária à desnutrição durante a infância (Stoch et al., 1982). Em um estudo chileno que avaliou graduandos do ensino fundamental, aproximadamente 70% dos alunos com pontuação inferior à média em um teste de aptidão acadêmica, apresentavam PC abaixo do normal (Ivanovic et al., 1996). Ivanovic et al (Ivanovic et al., 2000), mostraram que as crianças desnutridas apresentavam

quociente intelectual (QI) e alcance escolar significativamente inferiores aos das bem nutridas, e isto estava fortemente associado com baixo peso ao nascimento, PC e volume cerebral.

Do ponto de vista experimental, também existem evidências de que a desnutrição precoce resulte em deficiência cognitiva. Diversos autores, através do labirinto aquático de Morris (LAM), aparato mais utilizado para avaliação cognitiva de roedores, mostraram que a desnutrição intra-útero, assim como a desnutrição por privação da lactação, afeta a memória espacial e a persistência do aprendizado (Huang et al., 2003; Jordan et al., 1981; Wang & Xu, 2007).

Um dos principais aspectos em pesquisas sobre desnutrição é fato de que diminuições da plasticidade sináptica possam ser mecanismos cerebrais críticos por trás de deficiências de aprendizado, observados como resultado de insultos nutricionais ao cérebro em desenvolvimento. Já foi mostrado que no cérebro desnutrido é difícil induzir e manter a LTP (Bronzino et al., 1996). Bronzino et al (Bronzino et al., 1991) afirmaram que a desnutrição protéica gestacional altera a indução de LTP hipocampal em animais de 15, 30 e 90 dias de vida. Estes mesmos autores, em outro estudo, mostram a perpetuação da alteração de plasticidade ao longo do tempo, mesmo após reabilitação nutricional adequada (Bronzino et al., 1997).

2.5 EPILEPSIA E MEMÓRIA

Dados clínicos e experimentais referem o período neonatal como uma fase de maior suscetibilidade ao desenvolvimento de convulsões e de epilepsia. Crianças com epilepsia têm risco significativo de desenvolverem uma diversidade de alterações cognitivas e comportamentais (Lombroso et al., 1998). Mesmo crianças com QI normal e crises convulsivas bem controladas apresentam grande risco de desenvolverem problemas de aprendizado (Holmes, 2005).

Distúrbios do aprendizado são desordens que interferem com o desempenho acadêmico ou com as atividades diárias que requerem leitura, escrita e habilidades matemáticas em indivíduos com um QI normal. Beghi et al (Beghi et al., 2006), assim como outros autores (Sillanpaa, 1992), apontam que os distúrbios do aprendizado são mais comuns em pessoas com epilepsia, quando comparados com a população geral:

aproximadamente 25% dos pacientes com epilepsia apresentam algum tipo de distúrbio do aprendizado e mais do que 50% das crianças com problemas de aprendizado apresentam epilepsia (Lhatoo, 2001). Sabe-se, também, que aproximadamente 50% das crianças com epilepsia apresentam dificuldades escolares (Adelkamp et al., 1990), sendo o prejuízo de memória o problema cognitivo mais referido por estas crianças (Strauss et al., 1995). Diversos fatores relacionados à epilepsia afetam a memória, estando o número de anos de epilepsia ativa diretamente associados ao dano na mesma (Delaney et al., 1980). Dodrill (Dodrill, 1986) concluiu que, em uma população de pacientes com todos os tipos de crises, os que tiveram mais de 100 crises secundariamente generalizadas foram os que apresentaram os piores resultados nos testes de função cognitiva e intelectual, incluindo memória (Hendriks et al., 2004). Hermann et al (Hermann et al., 2002; Hermann et al., 2006), estudando crianças com epilepsia, viram que as crises convulsivas não só reduzem o volume cerebral total como também reduzem o *status* intelectual e afetam a memória. Outros autores também já haviam relatado esta relação (Dow et al., 2004; Hermann, 2005)

Do ponto de vista experimental, encontramos alterações significativas na memória espacial após modelo de crises convulsivas (McCabe et al., 2001; Nadler, 1981). Muitos experimentos confirmaram os achados clínicos de que crises prolongadas podem acarretar uma variedade de efeitos adversos na cognição, memória e comportamento (Dodrill & Wilensky, 1990; Holmes, 1997; Liu et al., 1995). Os efeitos comportamentais secundários a um *status epilepticus*, por exemplo, estão associados com a idade do animal na época do evento: animais adultos que sobreviveram a um *status epilepticus* apresentaram deficiência substancial no aprendizado, memória e comportamento; nos ratos jovens, estas deficiências são mais amenas (Kelsey et al., 2000; Rice et al., 1998; Stafstrom et al., 1993). Assim como crises prolongadas, crises recorrentes podem ser danosas. Crises convulsivas neonatais recorrentes induzidas em ratos, através de flurothyl inalatório, causam prejuízo de memória espacial (Holmes et al., 1998), e estas alterações comportamentais podem ocorrer mesmo sem perda celular aparente (Riviello et al., 2002).

Embora as crises convulsivas possam induzir alterações em múltiplas áreas cerebrais, o hipocampo tem sido particularmente muito bem estudado, pois esta região é mais vulnerável às injúrias secundárias às crises convulsivas. Sabendo da importância do hipocampo nos mecanismos de memória, não nos é surpresa que as deficiências estruturais decorrentes de crises convulsivas sejam acompanhadas de deficiências no aprendizado e memória (Holmes, 2002). Apesar do significado funcional da proliferação em CA3 após

crises neonatais não estar claro, existe uma correlação entre o grau de proliferação das células musgosas em CA3 e a performance no LAM: os animais com maior proliferação desempenham pior no labirinto do que os com menor proliferação (Rogalski et al., 2001).

Estudos eletrofisiológicos em hipocampo de roedores mostraram que atividades convulsivas repetidas apresentam um efeito deletério em uma forma importante de plasticidade sináptica, a LTP, que parece ser a base da formação da memória. Tudo indica que a atividade epiléptica por si leve a uma indução indiscriminada da LTP consumindo e, conseqüentemente, reduzindo a plasticidade hipocampal disponível para o processamento da informação. Assim sendo, são vistas deficiências no aprendizado dependente do hipocampo em ratos que sofreram tanto crises convulsivas recorrentes (Zhou et al., 2007; Reid & Stewart, 1997), quanto *status epilepticus* (Liu et al., 2003).

2.6 DESNUTRIÇÃO, EPILEPSIA E MEMÓRIA

Desnutrição e Epilepsia são problemas comuns em países em desenvolvimento, sendo uma relação causa-efeito sugerida em diversos estudos (Bronzino et al., 1990; Gietzen et al., 1996; Palencia et al., 1996). Há uma maior prevalência de epilepsia nestes países, onde também ocorre maior índice de desnutrição. A maioria das causas, especialmente infecciosas e perinatais, de epilepsia na infância, estão fortemente ligadas à pobreza e à desnutrição. Assim, desnutrição e epilepsia podem coexistir, constituindo importante problema de saúde pública (Hackett & Iype, 2001). Apesar da desnutrição não ser uma causa direta de epilepsia sabe-se que pode diminuir o limiar convulsivo (Bronzino et al., 1986), o que pode contribuir para uma ocorrência maior destes eventos em populações com tais características nutricionais (Nunes, 2001).

Durante o desenvolvimento das redes corticais do SNC existe uma troca seqüencial de células imaturas, que apresentam uma comunicação falha e desorganizada, por uma rede madura, composta por neurônios com milhares de sinapses ativas (Ben-Ari & Holmes, 2006). Esta troca é mediada por uma série de eventos que incluem tanto fatores internos quanto externos. Desta forma, tanto a desnutrição como a epilepsia podem modificar estas redes, acarretando efeitos cerebrais deletérios e persistentes.

Parece existir um predomínio de crises convulsivas em recém-nascidos de baixo peso como conseqüência de desnutrição intra-uterina (Lombroso et al., 1998). Sabe-se que,

sob algumas circunstâncias, crises convulsivas em uma fase precoce da vida podem acarretar alterações cerebrais e alterar a plasticidade cerebral. A extensão das alterações celulares que ocorrem após as crises é variável e assim, outros fatores devem ser levados em conta como, por exemplo, uma história prévia de desnutrição e a existência de uma suscetibilidade genética às crises ou à formação de displasias (Moshé, 2000).

Um grande número de evidências sugere que a memória depende de um hipocampo adequadamente funcionando (Liu et al., 2003). Como é sabido que o hipocampo em desenvolvimento é particularmente vulnerável aos insultos neurológicos, incluindo desnutrição e crises convulsivas, é válido questionar se, durante a infância, estes insultos são capazes de ocasionar déficit cognitivo. Uma propriedade importante da circuitaria hipocampal, que tem sido utilizada para estudar desnutrição, epilepsia e outros insultos cerebrais, é a de que a eficácia sináptica pode ser aumentada ou diminuída através da ativação de repetidos *inputs* aferentes (Morgane et al., 2002). Assim, a formação hipocampal tem se destacado em estudos tanto de plasticidade sináptica quanto de processos de memória. É amplamente aceito que os aspectos fundamentais, tanto da plasticidade sináptica quanto dos processos de memória, podem ser perturbados por insultos perinatais como desnutrição e crises convulsivas (Morgane et al., 2002). Muito do conhecimento que se tem atualmente sobre aprendizado e memória derivam de estudos da LTP no hipocampo (Ben-Ari & Represa, 1990). Estudos comportamentais em animais, assim como estudos neuro-patológicos em humanos, validaram o papel essencial da formação hipocampal em consolidar a informação em memória duradoura. Este aumento seletivo na resistência sináptica permanece como modelo predominante para um mecanismo celular de aprendizado e memória (Austin et al., 1992).

Um objetivo, a longo prazo, nesta área, é relacionar dados quantitativos anatômicos, fisiológicos e neuroquímicos às funções cognitivas integradas, como o processamento de informações, memória e julgamento, que produzem os comportamentos complexos que descrevemos como inteligência (Morgane et al., 2002).

Na literatura, existem poucos trabalhos em roedores que avaliam a interação entre desnutrição, epilepsia e memória viso-espacial. Huang et al (Huang et al., 2003), por exemplo, não apontaram piora significativa na memória de ratos desnutridos quando submetidos a um *status epilepticus*.

Considerando a existência de um número substancial de crianças com desnutrição e epilepsia é importante saber os efeitos da epilepsia no cérebro desnutrido, principalmente no que diz respeito à memória, entretanto, é interessante ressaltar que sob o ponto de vista experimental, modelos que reproduzam esta situação tem sido alvo de poucos estudos.

Considerando o comportamento epidemiológico de tais situações clínicas e a importância de uma maior fundamentação fisiopatológica acerca destas questões, especialmente no que se refere à influência específica sobre a memória, procuramos desenvolver um modelo experimental que reproduzisse esta situação clínica.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- 3.1.1 Verificar os efeitos da desnutrição precoce, das crises convulsivas recorrentes e do *status epilepticus* na retenção da memória espacial de ratos jovens e verificar se existe interação entre estas condições sobre a memória espacial dos animais.

3.2. ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Verificar os efeitos da desnutrição precoce, das crises convulsivas recorrentes e do *status epilepticus* no peso corporal dos ratos jovens.
- 3.2.2 Verificar os efeitos da desnutrição precoce, das crises convulsivas recorrentes e do *status epilepticus* no peso cerebral dos ratos jovens.
- 3.2.3 Verificar os efeitos da desnutrição precoce, das crises convulsivas recorrentes e do *status epilepticus* na aquisição da memória espacial dos ratos jovens.
- 3.2.4 Verificar se os animais desnutridos são mais susceptíveis ao *status epilepticus*.

4 METODOLOGIA

Foram utilizadas, neste estudo, 10 ratas prenhas do tipo *Wistar* e suas ninhadas. As ratas tiveram livre acesso à água e ração desde o acasalamento e foram mantidas em sistema claro/escuro (12/12h), em gaiolas individuais, higienizadas, com temperatura ambiental adequada. As ninhadas foram limitadas a 10 filhotes por gaiola, sendo todos os animais filhos da mesma mãe. A idade dos filhotes foi calculada em dias de vida pós-natal, sendo o dia de nascimento da ninhada considerado como P0, e os dias subsequentes como P1 à P30. A ninhada foi alocada em seis grupos e foram usados apenas filhotes machos. Os grupos foram os seguintes: NC: Nutridos Controles (n=12), NCR: Nutridos Crises Recorrentes (n=12), NSE: Nutridos *Status Epilepticus* (n=12), DC: Desnutridos Controles (n=10), DCR: Desnutridos Crises Recorrentes (n=17) e DSE: Desnutridos *Status Epilepticus* (n=12). A metade dos animais foi submetida ao Paradigma da Desnutrição (NC, NCR e NSE) a outra metade (DC, DCR, DSE) foi alimentada normalmente (aleitamento materno). De P2 à P4 os animais dos grupos NCR e DCR foram submetidos a crises recorrentes breves (três crises por dia com uma hora de intervalo entre as mesmas), induzidas por flurothyl. Em P15, os animais dos grupos NSE e DSE foram submetidos a um *status epilepticus*, induzido por esta mesma droga. Nesta ocasião era determinado o limiar para a primeira crise tônico-clônica. De P21 à P26, todos os animais foram testados no LAM para avaliação de aprendizado e memória espaciais. Em P30, os animais foram sacrificados com uma overdose de tiopental e os cérebros foram removidos e pesados. Todas as ninhadas foram pesadas diariamente durante o experimento.

4.1 PARADIGMA DA DESNUTRIÇÃO

O paradigma de desnutrição empregado consistiu em limitar a lactação separando metade da prole (grupos DC, DCR, DSE) da fêmea nutriz, através da retirada da mesma da gaiola, por períodos crescentes de tempo. O período de privação iniciou em P2 com 2 horas de afastamento e foi aumentado diariamente, em 2 horas, até atingir 12 horas, ficando então fixo até P15. Durante o afastamento, os animais foram mantidos em gaiola aquecida, de forma que sua temperatura corporal permanecesse constante (aproximadamente 34°C). Após o período de privação nutricional, os filhotes retornaram para as suas gaiolas com livre acesso à fêmea nutriz. Os animais dos grupos nutridos permaneceram sempre em suas gaiolas, com livre acesso à lactação. Todos os animais foram pesados diariamente, de P2 a P30.

A figura 1 mostra a diferença nos tamanhos de um rato nutrido e de um desnutrido, da mesma idade.

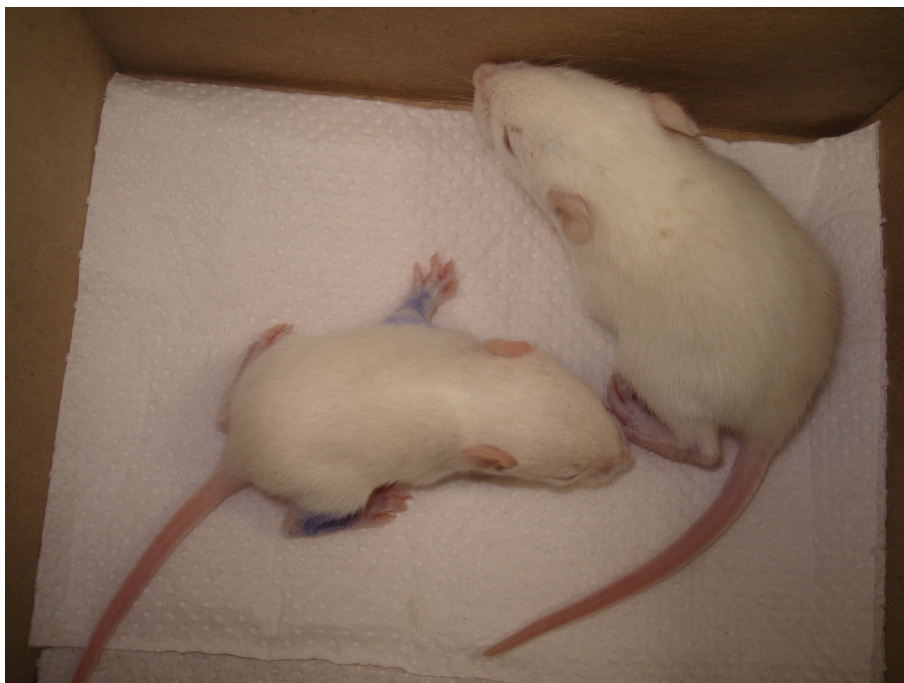


Figura 1. Comparação dos tamanhos de um rato nutrido e um desnutrido da mesma idade.

4.2 CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR FLUROTHYL

O flurothyl [bis-(2,2,2 – trifluorethyl) éter) (99% min.) é um agente volátil, bloqueador de receptor GABA A, que estimula rapidamente o sistema nervoso central, induzindo crises convulsivas generalizadas (Truitt et al., 1960; Velisková et al., 1996).

De P2 a P4, os animais dos grupos NCR e DCR foram submetidos às crises convulsivas recorrentes de curta duração (três crises por dia com uma hora de intervalo entre as mesmas). Os ratos foram testados na câmara vedada de flurothyl (9,38L), em grupos de três, sendo o fluxo mantido constante em 20 μ L/minuto (Figura 2). O gotejo foi suspenso após a primeira crise tônico-clônica de qualquer um dos três animais, quando todos, então, foram removidos da câmara. Em P15, os ratos dos grupos NSE e DSE foram submetidos a um *status epilepticus* na mesma câmara, em grupos de três e com o mesmo fluxo. Os animais permaneceram na câmara por 30 minutos, sendo que o gotejo foi suspenso no vigésimo minuto. Para cada animal dos grupos NSE e DSE, a primeira crise tônico-clônica foi registrada para verificação do limiar convulsivo. Posteriormente aos dois tipos de crises, os ratos recuperaram-se em ar ambiente, em gaiola aquecida, retornando ao restante da ninhada após término das crises clínicas. Entre as exposições ao flurothyl, a câmara foi limpa com vácuo e ar ambiente.

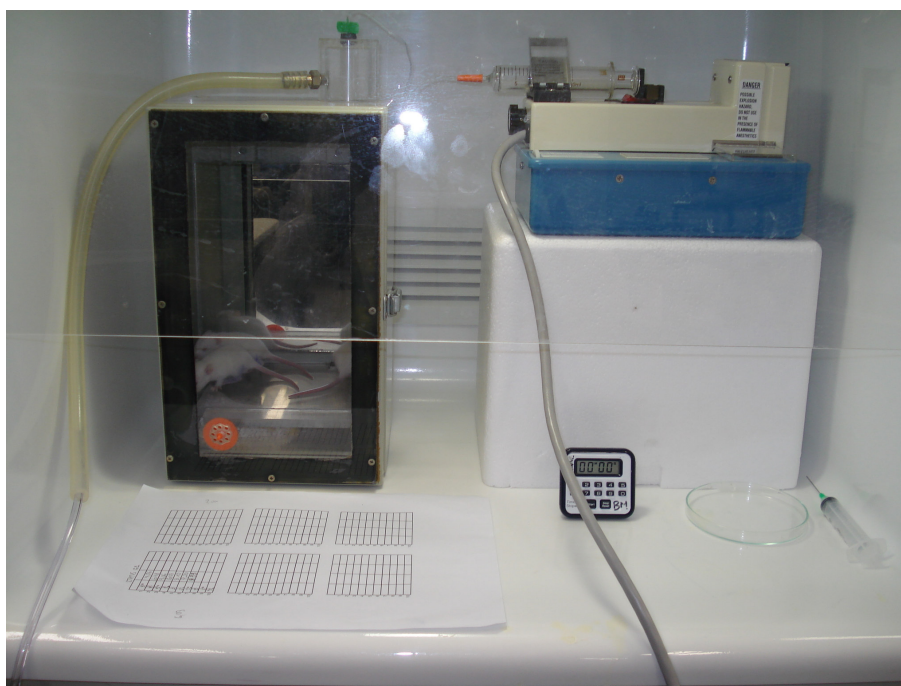


Figura 2. Equipamento utilizado na aplicação da técnica do flurothyl.

4.3 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS (LAM)

O LAM foi desenvolvido há mais de 20 anos por Richard G. Morris (Morris, 1984) como um instrumento para investigar aprendizado espacial em roedores. A relativa simplicidade do LAM é indubitavelmente umas das razões para seu sucesso. Na sua versão espacial (também denominada de “plataforma oculta”), esta tarefa está baseada em uma capacidade universal, a utilização de dicas ambientais para encontrar um alvo que, ao permitir o escape de uma situação desprazerosa, atua como reforço positivo. De fato, o LAM é o modelo comportamental mais amplamente usado para analisar a participação do hipocampo no processamento de informação espacial. O paradigma é plástico o suficiente para poder ser adaptado com êxito à análise de diferentes fases e modalidades do processamento do traço mnemônico espacial, onde um maior número de sessões de treino, ou bem a execução do mesmo durante vários dias conduz ao estabelecimento de um mapa mnemônico perdurável, claramente evidenciado pelo surgimento de uma marcada preferência espacial. O LAM é um teste de memória espacial hipocampo dependente, o paralelo mais próximo da memória episódica dos humanos (Jeltsch et al., 2001).

O LAM utilizado em nossos experimentos encontra-se em uma sala ampla, bem iluminada (iluminação indireta) e sem janelas, a qual foi especialmente construída nas instalações do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUC-RS (Figura 3). O labirinto em si consiste de uma piscina circular feita de concreto rebocado e impermeabilizado pintada de cor preta (2 m de diâmetro e 0,6 m de altura). Um cilindro de acrílico preto (1m de diâmetro e 0,6m de altura) foi colocado dentro da piscina durante o experimento, para limitar seu tamanho aos ratos filhotes (Figura 4). A piscina está conceitualmente dividida em 4 quadrantes imaginários idênticos (Figura 5). Dois centímetros abaixo da água (mantida entre 21 e 23°C durante todo o experimento) e oculta da vista do sujeito experimental encontra-se uma plataforma de escape de 8cm de diâmetro. A superfície da plataforma é abrasiva para permitir que o animal suba nela assim que a detectar. O LAM está rodeado de numerosos elementos claramente visíveis e de cores e motivos contrastantes ainda que comportamentalmente neutros (figuras, fotografias, desenhos geométricos e abstratos, etc.) pendurados das paredes da sala (Figura 6). Estes elementos servem como dicas de localização espacial e sua posição pode ser mudada à vontade do experimentador.



Figura 3. Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.



Figura 4. Cilindro utilizado para limitar o tamanho da piscina do LAM.

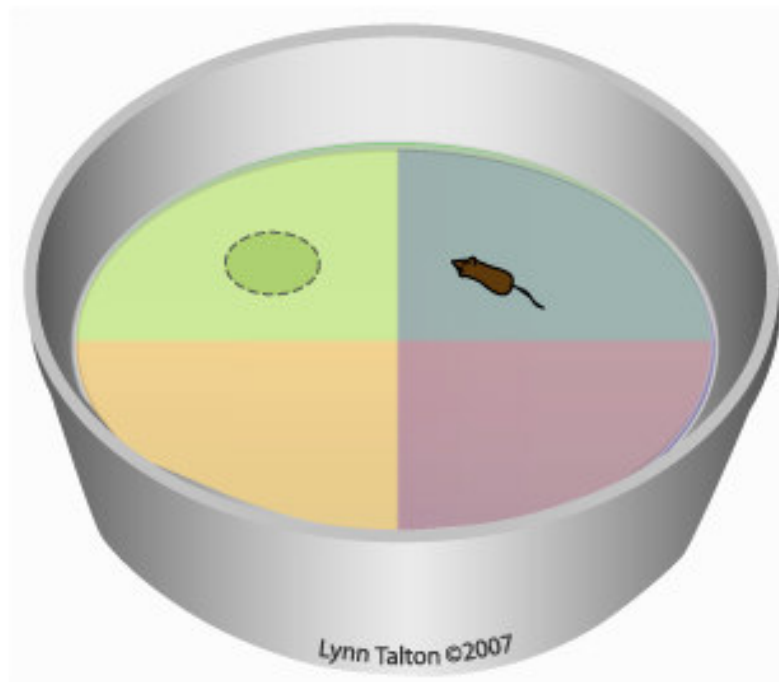


Figura 5. Esquema representativo do LAM (I).

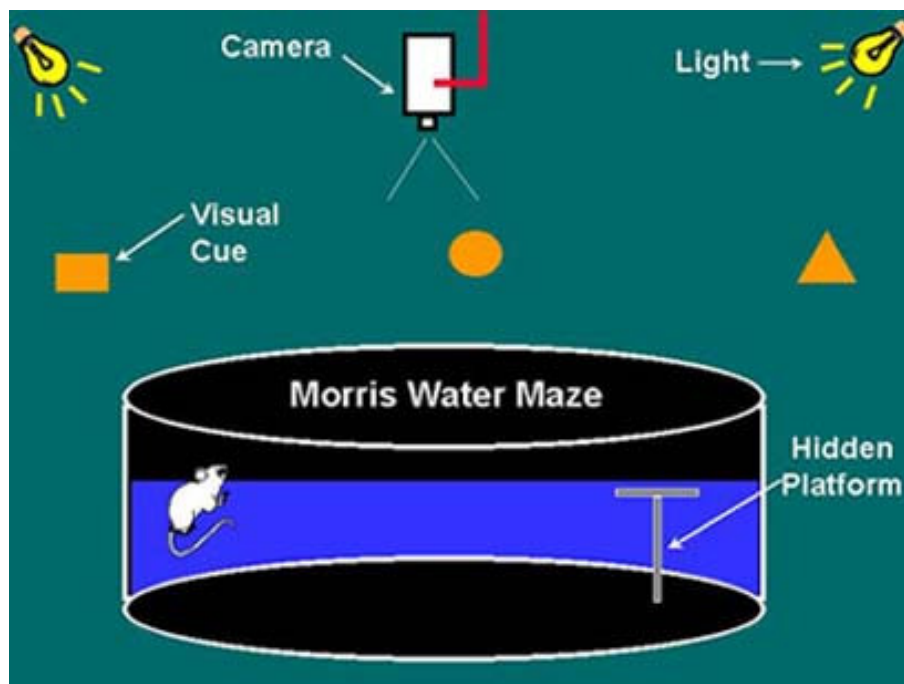


Figura 6. Esquema representativo do LAM (II).

4.3.1 Aprendizado espacial no Labirinto Aquático de Morris

A partir de P21, todos os animais foram testados no LAM por 6 dias. O treino na versão espacial do LAM consistiu de uma sessão diária de quatro largadas durante 5 dias (Rossato et al., 2006). A plataforma de escape foi mantida na mesma posição durante os 5 dias de treino. Cada uma das quatro largadas diárias foi iniciada de uma posição distinta da piscina de acordo com um padrão pseudo-aleatório gerado por um sistema computadorizado desenvolvido em nosso laboratório. A duração máxima da largada foi de 60s e se o animal não encontrasse a plataforma de escape neste período de tempo era conduzido até ela pelo experimentador, permanecendo sobre a mesma durante 30s. A retenção da memória no LAM foi avaliada em um teste de retenção (teste de prova) na ausência da plataforma de escape de 60s, realizado 24 h após o treino, no sexto dia. O tempo que o animal permaneceu nadando no quadrante alvo (quadrante onde a plataforma de escape esteve localizada durante o treino) foi utilizado como o principal indicador de retenção da memória espacial.

Durante os cinco dias do teste de aquisição, para cada animal foi medido o tempo que o mesmo levou desde sua largada na piscina até encontrar a plataforma. Durante o teste de prova, para cada filhote, foi medido o tempo que o mesmo levou para alcançar o local onde a plataforma de escape estava previamente localizada e foi analisada a porcentagem de tempo gasta no quadrante alvo, por cada animal. O teste de aquisição fornece uma medida de memória de referência espacial, enquanto o teste de prova fornece uma medida da intensidade do aprendizado, um grau de retenção da memória espacial (Jeltsch et al., 2001).

Em P30, todos os ratos foram sacrificados com tiopental sódico intraperitoneal (0,1 ml/100g de peso corporal), e guilhotinados. O cérebro foi removido e pesado em balança digital (Ficculab V-1200®).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Os dados referentes à reabilitação nutricional e à suscetibilidade às crises foram analisados através do método de ANOVA como único critério de classificação.

Os dados referentes aos pesos corporais e cerebrais, assim como os dados referentes ao teste de prova do LAM foram analisados através do método de ANOVA com duplo critério de entrada.

Os dados referentes aos testes de aquisição do LAM foram analisados através do método de ANOVA com triplo critério de entrada.

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

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

4.5 CÁLCULO AMOSTRAL

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

5 ASPECTOS ÉTICOS

No presente estudo, os protocolos experimentais utilizados seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório. Todos os procedimentos foram realizados tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados. Os animais receberam cuidados adequados e foram submetidos ao mínimo possível de desconforto e estresse. Durante os procedimentos foram instituídas sedação e analgesia de acordo com a prática veterinária aceita.

O estudo foi aprovado pelo Comitê Científico de Ética em Pesquisa da PUC-RS, protocolo 941/06 , em 14 de agosto de 2006.

6 RESULTADOS

6.1 EFEITO DA DESNUTRIÇÃO E DAS CRISES CONVULSIVAS NO PESO CORPORAL

A tabela 1 e a figura 7 mostram que a média de ganho de peso corporal entre P2 e P15 foi menor nos animais desnutridos (grupos DC, DCP e DSE; $11,9 \pm 0,2$ g) do que nos nutridos (grupos NC, NCP e NSE; $17,8 \pm 0,2$ g; $F_{1;71} = 362,26$ $p < 0,001$). Da mesma maneira, a média de ganho de peso corporal foi menor nos animais submetidos às crises convulsivas recorrentes de P2 à P4 (grupos DCP e NCP; $14,6 \pm 0,3$ g) ou a um *status epilepticus* em P15 (grupos DSE e NSE; $13,6 \pm 0,3$ g) do que nos animais controles (grupos DC e NC; $16,3 \pm 0,3$ g; $F_{2;71} = 25,25$ $p < 0,001$). A análise realizada por ANOVA de duas vias indica uma interação entre desnutrição e crises convulsivas ($F_{2;71} = 10,70$ $p < 0,001$).

Tabela 1. Comparação do ganho de peso corporal (g) observado entre o dia 2 e dia 15 segundo o tipo de crise convulsiva e a desnutrição em ratos Wistar

Crise	n	ganho de peso (g)	dif.	Nutridos			Desnutridos		
				n	ganho de peso (g)	dif	n	ganho de peso (g)	dif
Controle	24	16,3±0,3	–	12	20,1±0,4		12	12,6±0,4	
CR	29	14,6±0,3	-1,7	12	16,6±0,4	-3,5	17	12,5±0,3	-0,1
SE	24	13,6±0,3	-2,7	12	16,7±0,4	-3,4	12	10,4±0,4	-2,2
Total	77	14,8±0,2	–	36	17,8±0,2	–	41	11,9±0,2	–

Os dados são apresentados como média±erro padrão. Efeito da crise no ganho de peso, $P < 0,001$; efeito da desnutrição no ganho de peso, $P < 0,001$; interação entre crise e desnutrição, $P < 0,001$. dif: diferença entre o grupo e o controle. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com duplo critério de classificação.

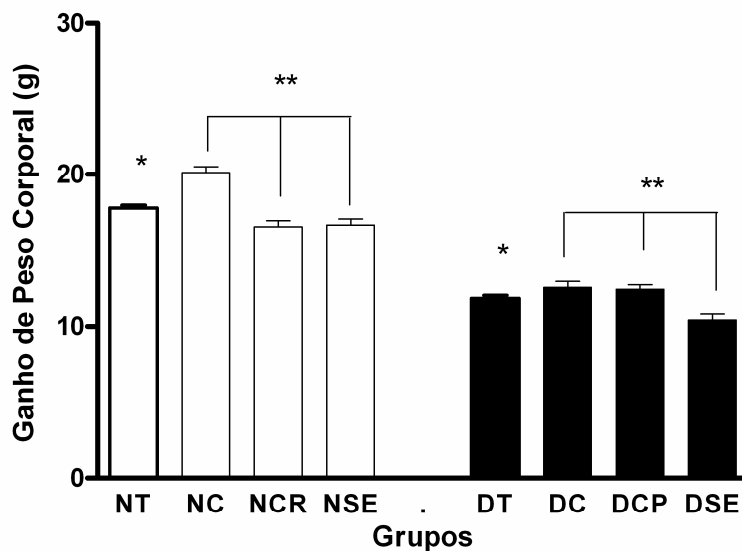


Figura 7. Comparação do ganho de peso corporal entre os grupos Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos), Nutrido Controle (NC), Nutrido Crise Recorrente (NCR), Nutrido Status Epilepticus (NSE), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos), Desnutrido Controle (UC), Desnutrido Crise Recorrente (DCR) e Desnutrido Status Epilepticus (DSE), entre P2 e P15, em ratos Wistar.

Efeito da desnutrição no ganho de peso corporal (* P [desnutrição] <0,001). Efeito da crises convulsivas no ganho de peso corporal(** P [crises convulsivas] <0,001). Interação desnutrição x crises convulsivas (P [desnutrição x crises convulsivas] <0,001)

6.2 EFEITO DA DESNUTRIÇÃO E DAS CRISES CONVULSIVAS NO PESO CEREBRAL

A tabela 2 e a figura 8 mostram que o peso cerebral em P30 foi menor entre os animais desnutridos (grupos DC, DCP e DSE; $1,26 \pm 0,20$ g) do que nos nutridos (grupos NC, NCP e NSE; $1,38 \pm 0,20$ g; $F_{1,71} = 53,63$ $p < 0,001$). Todavia, não houve diferença no peso cerebral entre os animais controles (grupos DC e NC; $1,32 \pm 0,14$ g) e os animais submetidos às crises convulsivas recorrentes de P2 a P4 (grupos DCP e NCP; $1,32 \pm 0,13$ g) ou ao *status epilepticus* em P15 (grupos DSE e NSE; $1,32 \pm 0,14$ g). A análise realizada

através de ANOVA de duas vias indica interação entre desnutrição e crises convulsivas ($F_{2;71}= 9,85$ $p<0,001$).

Tabela 2. Comparação do peso cerebral (g) observado no dia 30 segundo o tipo de crise convulsiva e a desnutrição em ratos Wistar

Crise	n	Peso cerebral (g)	dif.	Nutridos			Desnutridos		
				n	Peso cerebral (g)	dif	n	Peso cerebral (g)	dif
Controle	22	1,32±0,14	-	12	1,43±0,20	-	12	1,22±0,20	-
CR	29	1,32±0,13	-	12	1,33±0,20	-0,10	17	1,30±0,17	+0,06
SE	24	1,32±0,14	-	12	1,38±0,20	-0,05	12	1,26±0,20	+0,02
Total	77	1,32±0,08	-	36	1,38±0,12	-	41	1,26±0,11	-

Os dados são apresentados como média±erro padrão. Efeito da crise no peso cerebral, $P=0,972$; efeito da desnutrição no peso cerebral, $P<0,001$; interação entre crise e desnutrição, $P<0,001$. dif: diferença entre o grupo e o controle. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com duplo critério de classificação.

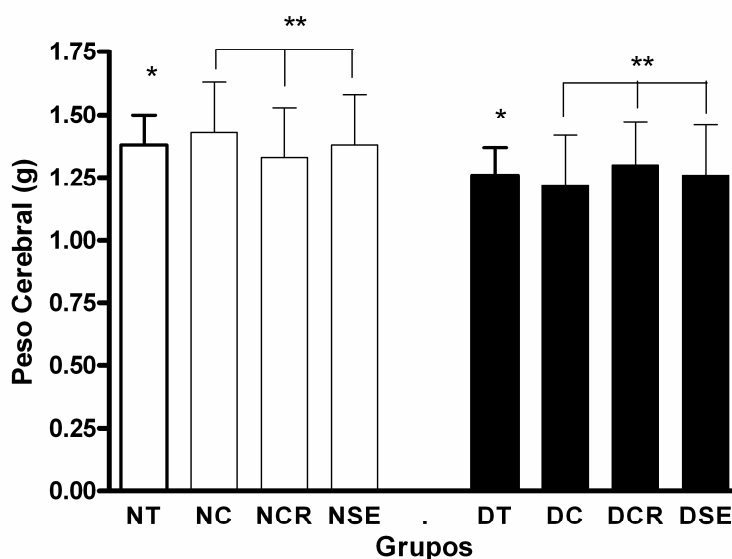


Figura 8. Comparação do peso cerebral entre os grupos Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos), Nutrido Controle (NC), Nutrido Crise Recorrente (NCR), Nutrido Status Epilepticus (NSE), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos), Desnutrido Controle (UC), Desnutrido Crise Recorrente (DCR) e Desnutrido Status Epilepticus (DSE), em P30, em ratos Wistar.

Efeito da desnutrição no peso cerebral (* P [desnutrição] $<0,001$). Efeito da crises convulsivas no peso cerebral(** P [crises convulsivas] $=0,972$). Interação desnutrição x crises convulsivas (P [desnutrição x crises convulsivas] $<0,001$).

6.3 EFEITO DO ESTADO NUTRICIONAL NO LIMIAR PARA CRISE CONVULSIVA

A análise realizada através do teste t de *Student* não mostrou diferença no tempo para início do *status epilepticus* entre os animais nutridos (grupos NC, NCP e NSE; $7,45 \pm 0,37$ min) e desnutridos (grupos DC, DCP e DSE; $7,88 \pm 0,41$ min), como visto na tabela 3 e na figura 9.

Tabela 3. Comparação do limiar para SE (s) observado no 15 dia de vida segundo a desnutrição em ratos Wistar

SE	Nutridos		Desnutridos	
	n	limiar (s)	n	limiar (s)
sim	12	$7,45 \pm 0,37$	12	$7,88 \pm 0,41$

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Efeito da desnutrição no SE, $P=0,45$. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com único critério de classificação.

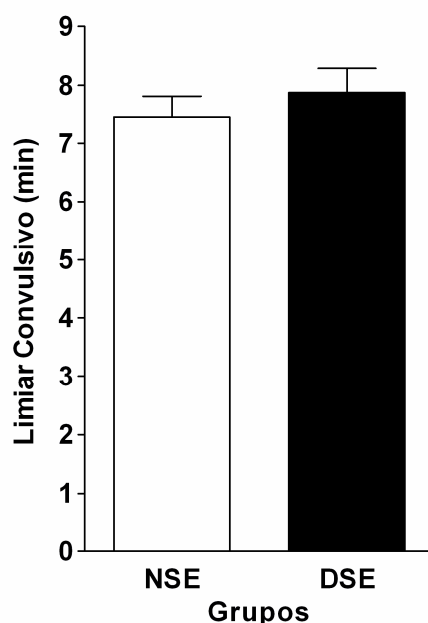


Figura 9- Comparação de limiar convulsivo do Flurothyl entre os animais que sofreram *status epilepticus* (grupos NSE e DSE), em P15, de acordo com o estado nutricional, em ratos Wistar.

Não houve diferença significativa no limiar convulsivo ($P=0,45$).

6.4 EFEITO DA DESNUTRIÇÃO E DAS CRISES CONVULSIVAS NA AQUISIÇÃO E RETENÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL

A tabela 4 (A) e a figura 10 (A) mostram as latências de escape para a plataforma oculta durante os 5 dias de treinamento no LAM. A análise através de ANOVA multifatorial indica que a latência de escape diminuiu em todos os grupos experimentais com o progresso do treino ($F_{3,5;247,3}=116,5$ $p<0,001$). Todavia, esta redução foi mais evidente entre os animais nutridos do que entre os desnutridos ($F_{1;71}= 14,0$ $p<0,001$) e em animais livres de crises, quando comparados aos animais que sofreram crises recorrentes de P2 a P4, ou *status epilepticus* em P15 ($F_{2;71}=9,6$ $p<0,001$). A análise indica que não existe interação entre desnutrição e crises convulsivas em relação à aquisição da memória espacial ($F_{2;71}= 2,42$ $p=0,096$). Como pode ser visto na tabela 4 (B) e na figura 10 (B), os animais desnutridos passaram menos tempo no quadrante alvo (grupos DC, DCP e DSE: $23,4 \pm 1,7\%$) do que os animais nutridos (grupos NC, NCP e NSE: $32,7 \pm 1,7\%$) ($F_{1;69}=15,33$ $p<0,001$), durante o teste de prova realizado em P26 (i.e. 1 dia após o último dia de treino no LAM). Da mesma maneira, os animais submetidos às crises convulsivas recorrentes de P2 a P4 (grupos DCP e NCP: $26,7 \pm 1,9\%$), ou ao *status epilepticus* em P15 (grupos DSE e NSE: $23,0 \pm 2,0\%$), passaram menos tempo no quadrante alvo do que os animais controles (grupos DC e NC: $34,5 \pm 2,1\%$) ($F_{2;69}=7,57$ $p=0,001$). Houve uma interação significativa entre desnutrição e crises convulsivas em relação à retenção da memória espacial ($F_{2;69}=4,62$ $p=0,013$).

Tabela 4 (A). Comparação da latência de chegada à plataforma oculta (s) observado entre os dias 1 e 5 (testes de aquisição) do LAM segundo o dia, o tipo de crise convulsiva e a desnutrição em ratos Wistar

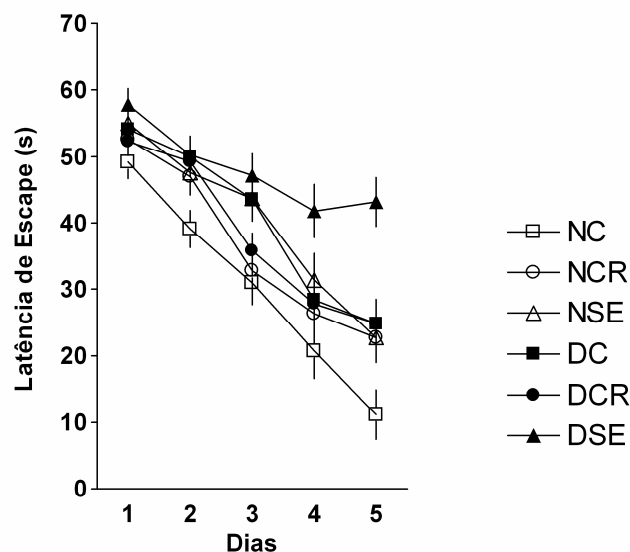
Crise	Dia	n	Latência(s)	Nutridos		Desnutridos	
				n	Latência(s)	n	Latência(s)
Controle	1	24	51,6±1,7	12	49,2±2,5	12	54,1±2,5
	2	24	44,5±2,0	12	39,1±2,8	12	50,0±2,8
	3	24	37,3±2,3	12	31,0±3,3	12	43,6±3,3
	4	24	24,5±2,9	12	20,7±4,1	12	28,4±4,0
	5	24	18,0±2,6	12	11,2±3,7	12	24,8±3,7
CR	1	29	52,5±1,6	12	52,6±2,4	17	52,3±2,0
	2	29	48,1±1,8	12	47,0±2,8	17	49,3±2,3
	3	29	34,3±2,1	12	32,8±3,3	17	35,8±2,7
	4	29	27,1±2,6	12	26,3±4,0	17	27,8±3,4
	5	29	22,7±2,4	12	22,7±3,7	17	24,8±3,7
SE	1	24	56,4±1,7	12	55,0±2,4	12	57,8±2,4
	2	24	49,0±1,8	12	47,6±2,8	12	50,3±2,8
	3	24	45,5±2,3	12	43,7±3,3	12	47,2±3,3
	4	24	36,6±2,8	12	31,4±4,0	12	41,8±4,0
	5	24	33,0±2,6	12	22,7±3,7	12	43,2±3,7

Os dados são apresentados como média±erro padrão. Efeito da crise na latência do aprendizado, $P<0,001$; efeito da desnutrição na latência do aprendizado, $P<0,001$; interação entre crise e desnutrição, $P=0,096$. dif: diferença entre o grupo e o controle. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com triplo critério de classificação.

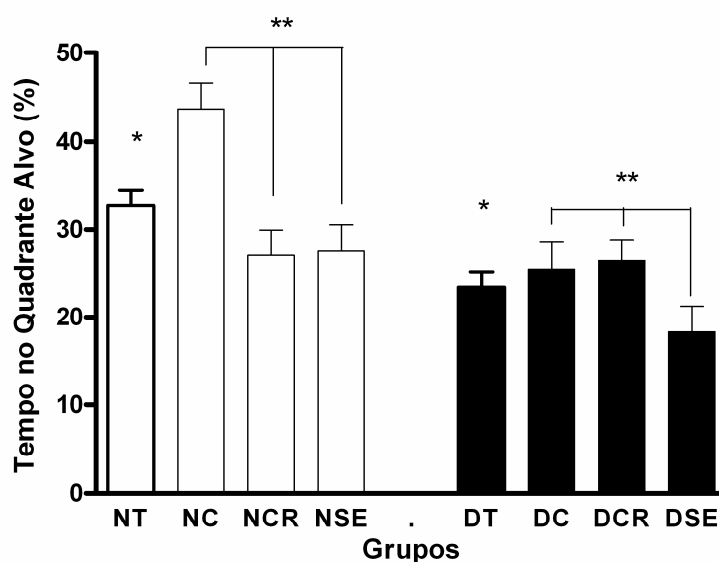
Tabela 4 (B). Comparação do tempo no Quadrante Alvo (QA) (%) observada no teste de prova do LAM segundo o tipo de crise convulsiva e a desnutrição em ratos Wistar

Crise	n	% tempo QA	dif.	Nutridos			Desnutridos		
				n	% tempo QA	dif	n	% tempo QA	dif
Controle	22	34,5±2,2	-	12	43,7±2,9	-	10	25,4±3,2	-
CR	29	26,7±1,9	-7,8	12	27,0±2,9	-16,6	17	26,4±2,4	+1,0
SE	24	23,0±2,1	-11,5	12	27,6±2,9	-16,0	12	18,3±2,9	-7,0
Total	75	28,1±1,2	-	36	32,7±1,7	-	39	23,4±1,7	-

Os dados são apresentados como média±erro padrão. Efeito da crise na % tempo no QA, $P=0,001$; efeito da desnutrição na % tempo no QA, $P<0,001$; interação entre crise e desnutrição, $P=0,013$. dif: diferença entre o grupo e o controle. Significâncias estatísticas obtidas em modelo de ANOVA com duplo critério de classificação.



(A) Teste de aquisição. Médias das latências de escape para a plataforma oculta do labirinto aquático de Morris em relação ao dia de treino. Efeito da desnutrição na latência de escape ($P[\text{desnutrição}] < 0,001$). Efeito das crises convulsivas na latência de escape ($P[\text{crises convulsivas}] < 0,001$). Interação desnutrição x crises convulsivas ($P[\text{desnutrição} \times \text{crises convulsivas}] < 0,096$).



(B) Teste de prova. A percentagem de tempo gasta no quadrante alvo, onde a plataforma estava previamente localizada durante o teste de aquisição, entre os grupos foi a seguinte: NT 32,7±1,7%; NC 43,7±2,9%; NCR 27,0±2,9%; NSE 27,6±2,9%; DT 23,4±1,7%; DC 25,4±3,2%; DCR 26,4±2,4%; DSE 18,3±2,9%. Efeito da desnutrição na percentagem de tempo no quadrante alvo ($*P[\text{desnutrição}] < 0,001$). Efeito das crises convulsivas na percentagem de tempo no quadrante alvo ($**P[\text{crises convulsivas}] = 0,001$). Interação desnutrição x crises convulsivas ($P[\text{desnutrição} \times \text{crises convulsivas}] = 0,013$).

Figura 10. Comparação da performance no labirinto aquático de Morris entre os grupos Nutrido Total (NT) (i.e. todos os animais nutridos), Nutrido Controle (NC), Nutrido Crise Recorrente (NCR), Nutrido Status Epilepticus (NSE), Desnutrido Total (DT) (i.e. todos os animais desnutridos), Desnutrido Controle (UC), Desnutrido Crise Recorrente (DCR) e Desnutrido Status Epilepticus (DSE).

7 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os dados do presente experimento indicam que o processo de desnutrição, ocorrido entre o segundo (P2) e décimo quinto (P15) dias de vida, reduz o ganho de peso corporal e o peso cerebral, assim como prejudica a memória espacial dos ratos, sem reduzir o limiar para crises convulsivas, através do modelo do flurothyl. Contudo, vimos que apesar da desnutrição e das crises convulsivas apresentarem um efeito aditivo deletério sobre o peso corporal e sobre a memória dos animais, o peso cerebral dos ratos desnutridos que sofreram crises convulsivas foi maior do que o dos animais desnutridos livres das mesmas.

Estudos prévios demonstraram que ratos desnutridos durante a gestação ou durante o período de lactação, quando submetidos às crises convulsivas na idade adulta, apresentaram menor limiar para as mesmas (Bronzino et al.,1986; Bronzino et al.,1990; Gietzen et al., 1996; Palencia et al., 1996; Taber et al.,1980). Da mesma forma, existem relatos de diminuição do limiar convulsivo após modelo de epilepsia por kindling e ácido caínico em ratos adultos (Dobbing et al., 1971; Dobbing 1976; Sarkisian et al., 1997). Todavia, neste experimento não observamos diferença na suscetibilidade ao *status epilepticus* entre os ratos nutridos e desnutridos, em P30. Este achado pode dever-se ao fato de o flurothyl ser uma droga que necessita ser administrada repetidamente para que tenha o poder de reduzir o limiar convulsivo (Grantham-Mc Gregor 1995; Hackett & Iype 2001). Mesmo sendo esta uma droga consistente na indução de crises convulsivas, discrepância similar já havia sido relatada em outros estudos, com modelo similar ao nosso (Nunes et al., 2000; Nunes et al., 2002).

O flurothyl que é um éter que ocasiona uma hiperexcitabilidade neuronal ao inibir a neurotransmissão GABA A (Grantham-Mc Gregor 1995; Hackett & Iype 2001; Hashimoto et al., 2006), foi escolhido para ser utilizado neste experimento porque, diferente de outros métodos convulsivantes, não apresenta o efeito de tornar o animal

epiléptico (ou crônico), isto é, ao usar o flurothyl não corremos o risco de que os animais apresentassem crises espontâneas, algo que poderia complicar a interpretação dos experimentos comportamentais no labirinto aquático de Morris.

Não houve diferença no peso cerebral entre os ratos livres de crises, ratos que sofreram crises precoces e ratos que sofreram *status epilepticus*, em P30. Diferentemente do que havia sido afirmado anteriormente por Wasterlain (Wasterlain, 1976a), de que seriam as crises convulsivas, e não o estado nutricional, as responsáveis por uma redução do peso cerebral de ratos desnutridos e epilépticos. Entre os ratos desnutridos, os que sofreram crises convulsivas apresentaram peso cerebral maior do que os que sofreram apenas desnutrição, contudo, os pesos dos seus cérebros permaneceram inferiores aos dos animais nutridos. Acreditamos que o edema cerebral secundário à associação deletéria entre desnutrição e crises convulsivas seja o responsável pelo aumento do peso cerebral destes animais. De fato, existem diversos estudos clínicos e experimentais que mostram que crises convulsivas, assim como deficiências nutricionais, são responsáveis por edema neuronal e cerebral (Almonte et al., 1999; Andrew & McVicar 1994; Briellmann et al., 2005; Carlton & Kelly 1969; Chan et al., 2004; Fountain 2000; Seitelberger et al., 1990).

Houve interação entre desnutrição e crises convulsivas no que diz respeito ao prejuízo na retenção da memória espacial, em P26, durante o teste de prova. Ao que sabemos, este é o primeiro experimento que mostra esta associação. Estudos clínicos relatam que tanto crianças desnutridas quanto crianças epilépticas, apresentam mais problemas de aprendizado e memória e sugerem uma maior tendência para epilepsia em crianças desnutridas (Cornelio-Nieto 2007; Guimarães et al., 2007; Nunes et al., 1999; Nunes et al., 2000). Experimentos anteriores mostraram existir prejuízo na memória espacial de animais tanto desnutridos quanto epilépticos, porém nunca havia sido relatada esta interação (Huang et al., 2003; Jordan et al., 1981; Majak & Pitkänen 2004).

De P2 a P15, os ratos desnutridos apresentaram menor ganho de peso corporal do que os nutridos, como esperado. Este dado comprova a eficácia do método experimental de restrição alimentar utilizado na redução significativa do peso corporal dos animais, mesmo após um curto período de privação alimentar (14 dias) (Nunes et al., 2002). O modelo de restrição alimentar por nós utilizado é similar ao processo de desnutrição que afeta famílias pobres em todo mundo (Grantham- Mc Gregor, 1995). É válido também lembrar que a forma de avaliação da desnutrição, através da medição do peso corporal, é similar à forma clínica da avaliação da desnutrição em humanos. Um problema deste paradigma é que a

separação dos filhotes de suas mães pode ter outros efeitos além de desnutrição, como o estresse gerado nos filhotes devido à separação (Genest et al., 2004; Huang et al., 2002). Todavia, até este efeito pode ser extrapolado para uma situação de desnutrição em humanos.

Em P30, os ratos desnutridos apresentaram menor peso cerebral do que os ratos nutridos. Clinicamente sabe-se que o encéfalo é protegido em detrimento de outras estruturas quando sob insulto nutricional (Hales & Barker 1992). Contudo, existem relatos de que a restrição alimentar durante a gestação de roedores acarreta alterações cerebrais tais como modificações corticais e diminuição do peso encefálico (Hernandez et al., 1985; Soto-Moyano et al., 1993), como ocorreu com nossos animais.

De P21 a P25, durante os cinco dias de testes de aquisição no labirinto aquático de Morris, houve uma diminuição progressiva na latência de escape para plataforma entre todos os animais. Isto significa que todos os animais aprenderam com o passar dos dias de treinamento. A redução na latência de escape foi mais evidente nos animais nutridos do que nos desnutridos, assim como foi também mais evidente nos animais livres de crises, quando comparados com os animais que sofreram crises recorrentes ou *status epilepticus*. Não houve interação entre desnutrição e crises convulsivas durante os testes de aquisição de memória espacial. Em P26, no teste de prova do labirinto aquático de Morris, os ratos desnutridos permaneceram menos tempo do que os nutridos no quadrante alvo. Da mesma forma, os animais que sofreram tanto crises recorrentes quanto *status epilepticus* permaneceram menos tempo no quadrante alvo do que os animais livres de crises. Como já dito anteriormente, houve interação entre desnutrição e crises convulsivas na percentagem de tempo permanecida no quadrante alvo. Sendo o teste de prova uma forma de medida da retenção de memória espacial, viu-se que as duas condições estudadas alteram esta retenção. O labirinto aquático de Morris é um teste que avalia a memória espacial hipocampo-dependente (Morris, 1984), o paralelo mais próximo da memória episódica de humanos (Jeltsch et al., 2001). O teste de aquisição, método usado durante os cinco dias de localização da plataforma oculta fornece uma medida de aquisição da memória de referência espacial, enquanto que o teste de prova, realizado sem a plataforma, provê uma medida de retenção desta memória. Existem relatos, tanto clínicos quanto experimentais, de alterações cognitivas e comportamentais, com prejuízo no aprendizado e memória, após desnutrição e epilepsia (Akman et al., 2004; Guardiola et al., 2001; Hoffmann et al., 2004; Huang et al., 2003; Majak & Pitkänen, 2004). Como dito anteriormente, ao que sabemos,

este parece ser o primeiro estudo mostrando a interação da desnutrição e crises convulsivas no dano cognitivo do rato jovem. Esta interação significa uma “comunicação”, uma relação entre as duas condições estudadas, no que diz respeito ao prejuízo da memória espacial destes animais.

8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste experimento pode-se concluir que:

1. A desnutrição, assim como as crises convulsivas, apresenta efeito sobre o cérebro imaturo em relação à retenção de memória espacial. Tanto a desnutrição precoce, como as crises convulsivas recorrentes e o *status epilepticus* atuam, de forma isolada, sobre o cérebro do rato jovem, de maneira prejudicial à sua memória espacial. Até aonde sabemos, este foi o primeiro experimento a demonstrar uma interação entre desnutrição e crises convulsivas no prejuízo referente à retenção da memória espacial de ratos filhotes.

2. Tanto a desnutrição precoce, como as crises convulsivas recorrentes e o *status epilepticus*, atuam de forma isolada sobre o peso corporal do rato jovem de maneira que os animais sob estas condições apresentam desvantagem significativa no ganho ponderal corporal, quando comparados aos controles. Foi observada uma interação entre desnutrição e crises convulsivas no que diz respeito a um menor peso corporal destes animais.

3. A desnutrição precoce atua de forma isolada na redução do peso cerebral do rato jovem de maneira que os animais sob esta condição apresentam desvantagem significativa no ganho ponderal cerebral quando comparados aos controles, fato que não ocorre com crises convulsivas recorrentes e *status epilepticus*. Foi observada interação entre desnutrição e crises convulsivas no que diz respeito a um maior peso cerebral destes animais, dado nunca antes relatado.

4. Tanto a desnutrição precoce como as crises convulsivas recorrentes e o *status epilepticus*, apresentam efeito significativo sobre o cérebro do rato jovem de maneira

prejudicial à aquisição de sua memória espacial. Todavia, não foi observada interação entre desnutrição e crises convulsivas no que se refere à aquisição de memória destes animais.

5. Não houve diferença na susceptibilidade às crises convulsivas (*status epilepticus*) entre os animais nutridos e desnutridos.

9 PERSPECTIVAS

A linha de pesquisa mostrou-se promissora no sentido de que novos experimentos podem dar continuidade à temática abordada na medida em que existem poucos estudos elucidados na literatura.

Pretende-se continuar com esta linha de pesquisa com os objetivos de:

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

- Incluir, em futuros experimentos, formas de reabilitação nutricional

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

- Incluir, em futuros experimentos, análise histológica cerebral.

- Incluir, em futuros experimentos, avaliação da LTP.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelmalik PA, Burnham WM, Carlen PL. Increased seizure susceptibility of the hippocampus compared with the neocortex of the immature mouse brain in vitro. *Epilepsia*. 2005 Mar;46(3):356-66.

Aicardi J. Epileptic syndromes in childhood. *Epilepsia*. 1998;29 Suppl 3:1-5.

Akman C, Zhao Q, Liu X, Holmes GL. Effect of food deprivation during early development on cognition and neurogenesis in the rat. *Epilepsy Behav*. 2004;5:446-54.

Aldenkamp AP, Alpherts WC, Dekker MJ, Overweg J. Neuropsychological aspects of learning disabilities in epilepsy. *Epilepsia*. 1990;31 Suppl 4:S9-S20.

Almonte RA, Heath DL, Whitehall J, Russell MJ, Patole S, Vink R. Gestational magnesium deficiency is deleterious to fetal outcome. *Biol Neonate*. 1999 Jul;76(1):26-32.

Amiel-Tison C, Gosselin J, Infante Rivard C. Head growth and cranial assessment at neurological examination in infancy. *Dev Med Child Neurol*. 2002;44:643-8.

Andrew RD, MacVicar BA. Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience*. 1994 Sept;62(2):371-83.

Austin KB, Beiswanger C, Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Galler JR, Morgane PJ. Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus. *Brain Res Bull*. 1992;28:245-55

Baddeley A. The episodic buffer: a new component of working memory? *Trend Cogn Sci*. 2000;4:417-23.

Beghi M, Cornaggia CM, Frigeni B, Beghi E. Learning disorders in epilepsy. *Epilepsia*. 2006;47 Suppl 2:14-8.

Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1985;14:375-403.

Ben-Ari Y, Holmes GL. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol*. 2006;5:1055-63.

- Ben-Ari Y, Represa A. Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 1990 Aug;13(8):312-8.
- Berger ML, Tremblay E, Nitecka L, Ben-Ari Y. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat III: postnatal development of kainic acid binding sites in the limbic system. *Neuroscience.* 1984;13:1095-104.
- Bernes SM, Kaplan AM. Evolution of neonatal seizures. *Pediatr Clin North Am.* 1994;41:1069-104.
- Bliss TVP, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973;232:331-56.
- Bolduc FV, Shevell MI. Microcephaly and developmental performance. *Devel Med & Child Neurol.* 2005;47:766-70.
- Borges MA, Min LL, Guerreiro CA, Yacubian EM, Cordeiro JA, Tognola WA, et al. Urban prevalence of epilepsy: populational study in Sao Jose do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004 Jun;62(2A):199-204.
- Botting N, Powls A, Cooke RW, Marlow N. Cognitive and educational outcome of very low-birth weight children in early adolescence. *Devel Med and Child Neurol.* 1998;40:652-60.
- Briellmann RS, Wellard RM, Jackson GD. Seizure-associated abnormalities in epilepsy: evidence from MR imaging. *Epilepsia.* 2005 May;46(5):760-6.
- Bronzino JD, Austin- La France RJ, Morgane PJ, Galler JR. Diet induced alterations in the ontogeny of long-term potentiation. *Hippocampus.* 1996;6:109-17.
- Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Morgane PJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on kindling induced alterations in dentate granule cell excitability: paired pulse measures. *Exp. Neurol.* 1991;112:216-23.
- Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ, Mokler D, Morgane PJ. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal long-term potentiation in freely moving rats. *Exp Neurol.* 1997;148:317-23.
- Bronzino JD, Austin-La France RJ, Chester JS, Morgane PJ. Effect of protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioral measures. *Brain Res.* 1986;84:348-54.
- Bronzino JD, Austin-La France JR, Morgane PJ. Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. *Brain Res.* 1990;515:45-50.
- Brown JL, Pollitt E. Malnutrition, poverty and intellectual development. *Sci Am.* 1996;274(2):38-43.

Burneo JG , Tellez-Zenteno J, Wiebe S. Understanding the burden of epilepsy in Latin America: a systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Res.* 2005;66:63–74.

Carlton WW, Kelly WA. Neural lesions in the offspring of female rats fed a copper-deficient diet. *J Nutr.* 1969 Jan;97(1):42-52.

Cavazos JE, Sutula TP. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res.* 1990;527:1–6.

Chan H, Butterworth RF, Hazell AS. Primary cultures of rat astrocytes respond to thiamine deficiency-induced swelling by downregulating aquaporin-4 levels. *Neurosci Lett.* 2004 Aug 19;366(3):231-4.

Cherubini E, Ben-Ari Y, Krnjevic K. Anoxia produces smaller changes in synaptic transmission, membrane potential and input resistance in immature rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 1989;62:882–95.

Cherubini E, Galarsa JL, Ben-Ari Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* 1991;14:515-9.

Clancy RR, Legido A. Postnatal epilepsy after EEG-confirmed neonatal seizures. *Epilepsia.* 1991;32:69-76.

Collins S, Dent N, Binns P, Bahwere P, Sadler K, et al. Management of severe acute malnutrition in children. *Lancet.* 2006;368:1992–2000.

Cornelio-Nieto JO. The effects of protein-energy malnutrition on the central nervous system in children. *Rev Neurol.* 2007;44:S71-S74.

Costa JC, Nunes ML, Fiori RM. Seizures in the neonatal period. *J Pediatr(Rio J).* 2001;77 Suppl 11:S115-S22.

Costa-Cruz RRG, Amâncio-dos-Santos A, Guedes RCA. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neurosci Lett.* 2006;401:271–5.

Cravioto J, Milan RA. Má nutrição e sistema nervoso central. In: Lefèvre AB, Diament A, Cypel S. *Neurologia infantil.* 2 ed. São Paulo: Atheneu; 1989. p.1207-31.

Delaney RC, Rosen AJ, Mattson RH, Novelly RA. Memory function in focal epilepsy: a comparison of non-surgical, unilateral, and temporal lobe and frontal lobe samples. *Cortex.* 1980;6:103–17.

Deupree DL, Bradley J, Turner DA. Age-related alterations in potentiation in the CA1 region in F344 rats. *Neurobiol Aging.* 1993;14:249–58.

Dobbing J. Malnutrition et développement du cerveau. *Recherche.* 1976;7:139-46.

Dobbing J, Hopewell JW. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. *Arch Dis Child*. 1971;46:736–7.

Dobbing J, Hopewell JW, Lynch A. Vulnerability of the developing brain: VII-permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. *Exp Neurol*. 1971;32:439-77.

Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*. 1979 Mar;3(1):79-83.

Dodrill CB. Correlates of generalized tonic-clonic seizures with intellectual, neuropsychological, emotional, and social function in patients with epilepsy. *Epilepsia*. 1986;27:399–411.

Dodrill CB, Wilensky AJ. Intellectual impairment as an outcome of status epilepticus. *Neurology*. 1990;40 Suppl 2:23–7.

Dow C, Seidenberg M, Hermann B. Relationship between information processing speed in temporal lobe epilepsy and white matter volume. *Epilepsy Behav*. 2004;5:919–25.

Dyson SE, Jones DG. Undernutrition and the developing nervous system. *Prog Neurobiol*. 1976;7(2):171-96.

Engel J, Pedley TA. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.

Epilepsy Foundation of America's Working Group on Status Epilepticus: recommendations. Treatment of convulsive status epilepticus. *JAMA*. 1993;270:854-9.

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

Fernandes JG, Sander JWAS. Epidemiologia e história natural das epilepsias. In: Costa JCC, Palmieri A, Yacubian EMT, Cavalheiro EA. *Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos*. São Paulo: Lemos; 1998. v.1, p.3-20.

Forsgren L. Incidence and prevalence. In: Wallace SJ, Farrell K, editors. *Epilepsy in children*. 2nd ed. London: Arnold; 2004. p.21–25.

Fountain NB. Status epilepticus: risk factors and complications. *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 2:S23-S30.

Galler JR, Barrett LR. Children and famine: long-term impact on development. *Ambul Child Health*. 2001;7:85–95.

Garcia-Ruiz M, Diaz-Cintra S, Cintra L, Corkidi G. Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res*. 1993;22:203–12.

- Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R. Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *J Physiol.* 2004;554:543–57.
- Gietzen DW, Dixon KD, Truong BG, Jones AC, Barret JA, Washburn DS. Indispensable amino acid deficiency and increased seizure susceptibility in rats. *Am J Physiol.* 1996;271:R18-24.
- Golarai G, Cavazos JE, Sutula TP. Activation of the dentate gyrus by pentylentetrazol evoked seizures induces mossy fiber synaptic reorganization. *Brain Res.* 1992;593:257–64.
- Grantham-Mc Gregor S. A review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development. *J Nutr.* 1995;125:2233S-8S.
- Guardiola A, Egewarth C, Rotta NT. Avaliação do desenvolvimento neuropsicomotor em escolares de primeira série e sua relação com o estado nutricional. *J Pediatr (Rio J).* 2001;77:189-196.
- Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I. *Epilepsia.* São Paulo: Ed. Lemos; 2000.
- Guimarães CA, Li LM, Rzezak P, Fuentes D, Franzon RC, Montenegro AM, et al. Temporal lobe epilepsy in childhood: comprehensive neuropsychological assessment. *J Child Neurol.* 2007;22:836-40.
- Hackett R, Iype T. Malnutrition and childhood epilepsy in developing countries. *Seizure.* 2001;10:554-8.
- Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992;35:595–601.
- Hashimoto Y, Araki H, Suemaru K, Gomita Y. Effects of drugs acting on the GABA-benzodiazepine receptor complex on flurothyl-induced seizures in Mongolian gerbils. *Eur J Pharmacol.* 2006;536:241-7.
- Haut SR, Veliskova J, Moshe SL. Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects. *Lancet Neurol.* 2004;3:608–17.
- Hendriks MPH, Aldenkamp AP, Alpherts WCJ, Ellis J, Vermeulen J, van der Vlugt H. Relationships between epilepsy-related factors and memory impairment [abstract]. *Acta Neurol Scand.* 2004;110:291–300.
- Hermann B. Investigating temporal lobe contribution to confrontation naming using MRI quantitative volumetrics. *J Int Neuropsychol Soc.* 2005;11:358–66.
- Hermann B, Jones J, Sheth R, Dow C, Koehn M, Seidenberg M. Children with new-onset epilepsy: neuropsychological status and brain structure. *Brain.* 2006;129:2609–19.

Hermann BP, Seidenberg M, Bell B. The neurodevelopmental impact of childhood onset temporal lobe epilepsy on brain structure and function and the risk of progressive cognitive effects [abstract]. *Prog Brain Res.* 2002;135:429-38.

Hernandez A, Ruiz S, Perez H, Sato-Moyano R. Effect of early malnutrition on dynamic properties of axodendritic synapses in the rat prefrontal cortex. *J Neurobiol.* 1985 Sep;16(5):389-93.

Hoffmann AF, Zhao Q, Holmes GL. Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the “two-hit hypothesis”. *Epilepsy Behav.* 2004;5:873-7.

Holmes GL. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia.* 1997;38:12–30.

Holmes GL. Seizure induced neuronal injury. *Neurology.* 2002;59 Suppl 5:S3–S6.

Holmes GL. Effects of seizures on brain development: lessons from the laboratory. *Pediatr Neurol.* 2005;33(1):1-11.

Holmes GL, Gairsa JL, Chevassus-Au-Louis N, Ben-Ari Y. Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects. *Ann Neurol.* 1998;44:845–57.

Huang L-T, Holmes GL, Lai MC, Hung PL, Wang CL, Wang TJ, et al. Maternal deprivation stress exacerbates cognitive deficits in immature rats with recurrent seizures. *Epilepsia.* 2002;43:1141–8.

Huang LT, Lai MC, Wang CL, Wang CA, Yang CH, Hsieh CS, et al. Long-term effects of early-life malnutrition and status epilepticus: assessment by spatial navigation and CREB serine133 phosphorylation. *Dev Brain Res.* 2003;145:213-8.

Ivanovic D. Does undernutrition during infancy inhibit brain growth and subsequent intellectual development [comments]. *Nutrition.* 1996;12:568.

Ivanovic DM, Leiva BP, Perez HT, Inzunza NB, Almagia AF, Toro TD, et al. Long-term effects of severe undernutrition during the first year of life on brain development and learning in Chilean high-school graduates. *Nutrition.* 2000;16:1056-63.

Ivanovic D, Olivares M, Castro C, Ivanovic R. Nutrition and learning of Chilean school children: Chile’s Metropolitan Region Survey 1986–1987. *Nutrition.* 1996;12:321-8.

Izquierdo I. Different forms of post-training memory processing. *Behav Neural Biol.* 1989;51:171-202.

Izquierdo I. *Memória.* Porto Alegre: Artmed; 2002.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation, the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;68:285-316.

Jeltsch H, Bertrand F, Lazarus C, Cassel JC. Cognitive performances and locomotor activity following dentate granule cell damage in rats: role of lesion extent and type of memory tested. *Neurobiol Learn Mem.* 2001;76:81–105.

Jordan TC, Cane SC, Howells KF. Deficit in spatial memory performance induced by early undernutrition. *Dev Psychobiol.* 1981;14:317-25.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of neural science.* 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1991.

Kelsey JE, Sanderson KL, Frye CA. Perforant path stimulation in rats produces seizures, loss of hippocampal neurons, and a deficit in spatial mapping which are reduced by prior MK-801. *Behav Brain Res.* 2000;107:59–69.

Lado FA, Laurela EC, Moshe SL. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brains. *Epileptic Disorders.* 2002 Jun;4(2):83-97.

Leiva Plaza BP, Inzunza BN, Pérez HT, Castro GV, Jansana M JM, Toro DT, et al. The impact of malnutrition on brain development, intelligence and school work performance. *Arch Latinoam Nutr.* 2001 Mar;51(1):64-71.

Leuba G, Rabinowicz T. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex: I. cellular densities, conical volume and total number of cells. *Exp Brain Res.* 1979;37:283-98.

Levitsky DA, Strupp BJ. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J Nutr.* 1995;125:2212S-20S.

Lhatoo SD, Sander AS. The epidemiology of epilepsy and learning disability. *Epilepsia.* 2001;42 Suppl 1:6–9.

Liu RS, Lemieux L, Bell GS, Sisodiya SM, Bartlett PA, Shorvon SD, et al. Cerebral damage in epilepsy: a population-based longitudinal quantitative MRI study. *Epilepsia.* 2005 Sept;46(9):1482-94.

Liu X., Muller RU, Huang LT, Kubie, JL, Rotenberg A, Rivard B, et al. Seizure-induced changes in place cell physiology: relationship to spatial memory. *J Neurosci.* 2003;23:11505–15.

Liu Z, Gatt A, Mikati M, Holmes GL. Long-term behavioral deficits following pilocarpine seizures in immature rats. *Epilep Res.* 1995;19:191–204.

Liu Z, Stafstrom CE, Sarkisian M, Tandon P, Yang Y, Hoti A, et al. Age-dependent effects of glutamate toxicity in the hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996;97:178–84.

Lombroso CT. Neonatal seizures: historic notes and present controversies. *Epilepsia.* 1996;37 Suppl:S5-S13.

Lombroso CT. Prognosis in neonatal seizures. *Adv Neurol.* 1983;34:p.101-13.

Lombroso CT, Nunes ML, Da Costa JC. Crises convulsivas no recém-nascido. In: Da Costa JC, Palmini A, Yacubian EM, Cavalheiro EA. Fundamentos neurobiológicos das epilepsias. São Paulo: Ed. Lemos; 1998. p.173-201.

Logroscino G, Hersdorffer DC, Cascino G, Annegers JF, Hauser WA. Time trends in incidence, mortality and case fatality after first episode of status epilepticus. *Epilepsia*. 2001;42(8):1031-35.

Loscher W. Animal models of intractable epilepsy. *Prog Neurobiol*. 1997;53:239-58.

Majak K, Pitkänen A. Do seizures cause irreversible cognitive damage? Evidence from animal studies. *Epilepsy Behav*. 2004;5:S35-S44.

Malina RM, Habicht JP, Martorell R, Lechtig A, Yarbrough C, Klein RE, et al. Head and chest circumferences in rural Guatemalan Ladino children, birth to seven years of age. *Am J Clin Nutr*. 1975;28(9):1061-70.

McCabe BK, Silveira DC, Cilio MR, Cha BH, Liu X, Sogawa Y, Holmes GL. Reduced neurogenesis after neonatal seizures. *J Neurosci*. 2001;21(6):2094-103.

McGaugh JL. Memory: a century of consolidation. *Science*. 2000;287:248-51.

Mello ED. Recuperação do desnutrido. In: Ferreira JS. *Pediatria: diagnóstico e tratamento*. Porto Alegre: ArtMed; 2005. p.141-6.

Mizrahi EM. Acute and chronic effects of seizures in the developing brain: lessons from clinical experience. *Epilepsia*. 1999;40 Suppl 1:S42-S50.

Mizrahi EM, Kellaway P. Characterization and classification of neonatal seizures. *Neurology*. 1987;37:1837-44.

Moore CI, Browning MD, Rose GM. Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged F344 rats. *Hippocampus*. 1993;4:11-8.

Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev*. 1993;17:91-128.

Morgane PJ, Austin K, Siok C, LaFrance R, Bronzino JD. Power spectral analysis of hippocampal and cortical EEC activity following severe prenatal protein malnutrition in the rat. *Brain Res*. 1985;354:211-8.

Morgane PJ, Moklera DJ, Gallera RJ. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002;26:471-83.

Morris R. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11:47-60.

Moshé SL. Brain plasticity and epilepsy [preface]. *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 6:S1-S2.

- Moshé SL. Seizures in the developing brain. *Neurology*. 1993;43 Suppl 5:S3-S7.
- Moshé SL, Albala BJ. Maturation changes in post-ictal refractoriness and seizure susceptibility in developing rats. *Ann Neurol*. 1983 May;13(5):552-7.
- Moshé SL, Sperber EF. Substantia nigra: mediated control of generalized seizures. In: Gloor G, Kostopoulos R, Naquet M, Avoli P, editors. *Generalized epilepsy: cellular, molecular and pharmacological approaches*. Boston: Birkhauser; 1998. p.355-67.
- Muller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ*. 2005;173(3):279-86.
- Myiamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long term potentiation on the hippocampus. *J Pharmacol Sci*. 2006;100:433-42.
- Nadler JV. Desensitization-like changes in GABA receptors binding of rat fascia dentate after entorhinal cortex lesion. *Neurosci Lett*. 1981;26(3):275-81.
- Nairismägi J, Pitkänen A, Kettunen MI, Kauppinen RA, Kubova H. Status epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: a histologic and MRI study. *Epilepsia*. 2006;47(3):479-88.
- Neill J, Liu Z, Sarkisian M, Tandon P, Yang Y, Stafstrom CE, Holmes GL. Recurrent seizures in immature rats: effect on auditory and visual discrimination. *Dev Brain Res*. 1996;95:283-92.
- Nunes ML. Desnutrição e desenvolvimento neuropsicomotor. *J Pediatr (Rio J)*. 2001;77:159-60.
- Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistella V. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. *J Pediatr (Rio J)*. 2002;78(1):39-44.
- Nunes ML, Liptáková S, Velísková J, Sperber EF, Moshé SL. Malnutrition increases dentate granule cell proliferation in immature rats after status epilepticus. *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 6:S48-S52.
- Nunes ML, Teixeira GC, Fabris I, Gonçalves RA. Evaluation of the nutritional status in institutionalized children and its relationship to the development of epilepsy. *Nutr Neurosci*. 1999;2:139-45.
- Palencia G, Calvillo M, Sotelo J. Chronic malnutrition caused by a corn-based diet lowers the threshold for pentylenetetrazole induced seizures in rats. *Epilepsia*. 1996;37:583-6.
- Parent JM, Janumpalli S, McNamara JO, Lowenstein DH. Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. *Neurosci Lett*. 1998;247:9-12.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 1997;17:3727-38.

Pelletier DI, Frongillo Jr EA, Schroeder DG, Habicht JP. A methodology for estimating the contribution of malnutrition to child mortality in developing countries. *J Nutr.* 1994;124:2106–22.

Prince DA, Wilder BJ. Control mechanisms in cortical epileptogenic foci: surround inhibition. *Arch Neurol.* 1967;16:194-202.

Reid IC, Stewart CA. Seizures, memory and synaptic plasticity. *Seizure.* 1997 Oct;6(5):351-9.

Rener-Primec Z, Lozar-Krivec J, Krivec U, Neubauer D. Head growth in infants with infantile spasms may be temporarily reduced. *Pediatr Neurol.* 2006;35:197-203.

Represa A, Niquet J, Pollard H, Khrestchatisky M, Ben-Ari Y. From seizures to neo-synaptogenesis: intrinsic and extrinsic determinants of mossy fiber sprouting in the adult hippocampus. *Hippocampus.* 1994;4:270–4.

Rice AC, Floyd CL, Lyeth BG, Hamm RJ, DeLorenzo RJ. Status epilepticus causes long-term NMDA receptor-dependent behavioral changes and cognitive deficits. *Epilepsia.* 1998;39:1148–57.

Riviello P, de Rogalski LI, Holmes GL. Lack of cell loss following recurrent neonatal seizures. *Brain Res Dev Brain Res.* 2002;135:101–4.

Rodier PM. Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Dev Med Child Neurol.* 1980;22:525–45.

Rogalski LI, Minokoshi M, Silveira DC, Cha BH, Holmes GL. Recurrent neonatal seizures: relationship of pathology to the electroencephalogram and cognition. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001;129:27–38.

Rogan MT, Ledoux JE. LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory-evoked responses in a fear conditioning circuit. *Neuron.* 1995;15:127-36.

Rossato JI, Bevilaqua LR, Lima RH, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neuroscience.* 2006;143:15-23.

Rotta LN, Schmidt AP, Mello e Souza T, Nogueira CW, Souza KB, Izquierdo IA, et al. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem Res.* 2003;28:1181–6.

Sankar R, Shin DH, Liu H, Mazarati A, Vasconcelos PA, Wasterlain CG. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci.* 1998;18:8382–93.

Sarkisian MR, Tandon P, Liu Z, Yang Y, Hori A, Holmes GL, et al. Multiple kainic acid seizures in the immature and adult brain: ictal manifestations and long-term effects on learning and memory. *Epilepsia.* 1997;38:1157-66.

Scher MS. Seizures in the newborn infant: diagnosis, treatment and outcome. *Clin Perinatol.* 1997;24:735-72.

Scher MS, Painter MJ. Controversies concerning neonatal seizures. *Pediatr Clin North Am.* 1989;36:281-311.

Schonheit B, Haensel P. Effect of nonspecific malnutrition on spine morphology of lamina V pyramidal cells of the cingulate area of juvenile and adult rats. *J Hirnforsch.* 1984;25:617-31.

Seitelberger F, Lassmann H, Hornykiewicz O. Some mechanisms of brain edema studied in a kainic acid model [abstract]. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1990;50(4-5):263-7.

Sillanpaa M. Epilepsy in children: prevalence, disability and handicap. *Epilepsia.* 1992;33:444-9.

Silva LFG, Nunes ML, Costa JC. Risk factors for developing epilepsy after neonatal seizures. *Pediatr Neurol.* 2004;30:271-7.

Soto-Moyano R, Hernandez A, Perez H, Ruiz S, Carreno P, Belmar J. Functional alterations induced by prenatal malnutrition in callosal connections and interhemispheric asymmetry as revealed by transcallosal and visual evoked responses in the rat. *Exp Neurol.* 1993 Jan;119(1):107-12.

Specht U, May T, Schulz R, Rohde M, Ebner A, Schmidt RC, et al. Cerebellar atrophy and prognosis after temporal lobe resection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997;62:501-6.

Sperber EF, Haas KZ, Romero MT, Stanton PK. Flurothyl status epilepticus in developing rats: behavioral, electrographic, histological and electrophysiological studies. *Dev Brain Res.* 1999;116:59-68.

Stafstrom CE, Chronopoulos A, Thurber S, Thompson JL, Holmes GL. Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures. *Epilepsia.* 1993;34:420-32.

Steiger JL, Galler JR, Farb DH, Russek SJ. Prenatal protein malnutrition reduces beta(2), beta(3) and gamma(2L) GABA(A) receptor subunit mRNAs in the adult septum. *Eur J Pharmacol.* 2002;446:201-2 .

Stoch MB, Smythe PM, Moodie AD, Bradshaw D. Psychosocial outcome and CT findings after gross undernourishment during infancy: a 20-year developmental study. *Dev Med Child Neurol.* 1982;24:419-36.

Strauss E, Loring D, Chelune G, Hunter M, Hermann B, Perrine K, et al. Predicting cognitive impairment in epilepsy: findings from the Bozeman Epilepsy Consortium: *J Clin Exp Neuropsychol.* 1995;17:909-17.

Taber KH, Fuller GN, Stanley JC, De France JF, Wiggins RC. The effects of postnatal undernourishment on epileptiform kindling of dorsal hippocampus. *Experientia.* 1980;36:69-70.

Truitt EB, Ebesberg EM, Ling ASG. Measurement of brain excitability by use of hexafluorodiethyl ether (Indoclon). *J Pharmacol Exp Ther.* 1960;129:445-53.

Velísková J, Velíšek L, Nunes ML, Moshé S. Developmental regulation of regional functionality of substantia nigra GABA A receptors involved in seizures. *Eur J Pharmacol.* 1996;309:167-73.

Wang L, Xu RJ. The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behavior and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats [abstract]. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007;16 Suppl 1:467-72.

Wasterlain CG. Developmental effects of seizures: role of malnutrition. *Pediatrics.* 1976a;57:197-200.

Wasterlain CG. Effects of neonatal status epilepticus on rat brain development. *Neurology.* 1976b Oct;26(10):975-86.

White HS. Animal models of epileptogenesis. *Neurology.* 2002;59 Suppl 5:S7–S14.

WHO. Epilepsy: aetiology, epidemiology and prognosis (revised Feb. 2001). WHO Fact Sheet (165):1-4 [capturado 2007 mai 31] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs165/en/print.html>

Wiggins RC, Fuller G, Enna SJ. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. *Life Sci.* 1984;35:2085-94.

Winick M. Malnutrition and brain development. *J Pediatr.* 1969;74(5):667-79.

Winick M, Rosso P. The effect of severe early malnutrition on cellular growth of human brain. *Pediatr Res.* 1969a;3:181-4.

Winick M, Rosso P. Head circumference and cellular growth of the brain in normal and marasmic children. *J Pediatr.* 1969b;74:774-8.

Yang Y, Tandon P, Liu Z, Sarkisian MR, Stafstrom CE, Holmes GL. Synaptic reorganization following kainic acid induced seizures during development. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998;107:169–77.

Zhou JL, Shatskikh TN, Liu X, Holmes GL. Impaired single cell firing and long-term potentiation parallels memory impairment following recurrent seizures. *Eur J Neurosci.* 2007;25:3667–77.

ANEXOS

ANEXO A. E-mail de aceitação do Editor da Revista Epilepsia.

Dear Dr. Nunes:

This is a computer generated message.

Thank you very much for submitting your manuscript to Epilepsia. Your manuscript entitled, Effects of undernourishment and seizures on memory and spatial learning in the developing rat brain has been successfully uploaded to Manuscript Central.

Please make note of your manuscript number: EPI-00796-2007. We will direct all future communications to you, the corresponding author, via e-mail.

We attempt to complete the review process as fast as possible, and Epilepsia is making strenuous efforts to ensure as short a turn-around time as is compatible with a high quality peer review process. Manuscript processing is entirely dependent on the timeliness of our reviewer feedback. It typically takes one week to assign reviewers and another 2-3 weeks to obtain reviews. If a reviewer does not return his/her comments within four weeks, another reviewer may be invited. Reminders are sent to tardy reviewers, but I'm sure you can understand that the requested deadline cannot be enforced.

Revised manuscripts are sent to the original reviewers unless the revisions are minor, in which case the Editor will usually make a final decision on the manuscript him/herself.

You can keep track of your manuscript by logging on and checking the status in your Author Center.
URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/epilepsia>

Thank you for your interest in Epilepsia.

Sincerely,

Phil Schwartzkroin and Simon Shorvon
Editors-in-Chief

Anexo B. Artigo enviado para a Revista Epilepsia.

Effects of undernourishment and seizures on memory and spatial learning in the developing rat brain

Marta Hemb MD¹, Máurer P Martins MD¹, Martín Cammarota PhD², Magda L Nunes MD, PhD³

¹ Division of Neurology – Hospital São Lucas –Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

² Associate Professor of Neurology – School of Medicine- Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

³Associate Professor of Neurology and Pediatrics – School of Medicine- Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Address correspondence and reprint requests to Dr. Magda L Nunes at Division of Neurology, Hospital São Lucas – PUCRS. Av. Ipiranga 6690/220, Porto Alegre, RS, Brazil 90610-000. Tel./fax: + 55 51 33394936

E-mail: nunes@pucrs.br

Running title: Memory and learning in the developing brain

Keywords: undernourishment, epilepsy, seizures, memory

Number of text pages: 23

Number of figures: 3

Summary

Purpose: In this study we evaluated the effects of undernourishment and seizures on memory and spatial learning in a model of developing brain.

Methods: Male Wistar pup rats were allocated to one out of six experimental groups as follows: Nourished Control (NC), Nourished Recurrent Seizures (NRS), Nourished Status Epilepticus (NSE), Undernourished Control (UC), Undernourished Recurrent Seizures (URS) or Undernourished Status Epilepticus (USE). UC, URS and USE groups were maintained on a starvation regimen from post-natal day 2 (P2) to post-natal day 15 (P15). URS and NRS groups suffered three daily flurothyl-induced seizures from P2 to P4. USE and NSE groups suffered a status epilepticus (SE) at P15. Beginning at P21 all groups were trained in the Morris water maze. At P30 the animals were sacrificed and their brains weighted.

Results: Our data indicate that early undernourishment does not alter seizure susceptibility at P15, but diminishes body and brain weight ($p < 0,001$), whereas seizures diminish body ($p < 0,001$) but not brain weight ($p = 0,972$). In the Morris water probe test we have observed that undernourished rats spent less time in the target quadrant than nourished animals ($p < 0,001$). Also, rats submitted to recurrent seizures and rats submitted to status epilepticus spent less time in the target quadrant than seizure-free animals ($p = 0,001$). There was a significant interaction between undernourishment and seizure ($p = 0,013$).

Discussion: Our findings show that undernourishment and seizures have a detrimental additive effect on body and brain weight as well as in spatial memory.

Keywords: undernourishment, epilepsy, seizures, memory, developing brain

Introduction

Undernourishment is responsible for serious physiological and morphological changes on the developing central nervous system (Huang et al., 2003; Hoffmann et al., 2004). During brain development, the first year of life is the most important period and whatever happens at this time will have indelible repercussions later in life (Costa et al., 2001). Clinical trials of undernourished children show that they have more learning, memory and behavioral problems than well-nourished children (Ivanovic et al., 2000; Guardiola et al., 2001; Franzon et al., 2004). In rodents, the adverse effects of undernourishment include, among others, changes in neurotransmitter release, decrease in brain size and altered neuroplasticity (Dobbing et al., 1971; Morgane et al., 2002; Rotta et al., 2003). In fact, prenatal and lactation malnutrition affects spatial memory in rats (Jordan et al., 1981; Huang et al., 2003). However, although it has been proposed that recovery of nutritional status is associated with plastic changes in different areas of the brain (Schoneit & Haensel, 1988), previous experiments with rats submitted to early malnutrition followed by nutritional rehabilitation have yielded controversial results (Sharma et al., 1990; Nunes et al., 2002).

Undernourishment is not a direct cause of epilepsy (Palencia et al., 1996), but it is known that it might diminish the threshold for seizures induction (Stern et al., 1974; Palencia et al., 1996). The neonatal period is considered the most susceptible life period for developing seizures (Erickson & Zetterstrom, 1979; Lombroso, 1996). This is so because of a combination of several factors, including higher excitation and lower inhibition thresholds (Moshé, 1993). Children with epilepsy, even those medicated for seizure control, are prone to have a smaller brain and altered neuroplasticity and, consequently, cognitive and behavioral deficits (Bailet & Turk, 2000; Liu et al., 2005). Indeed, studies with experimental animals have confirmed that recurrent or prolonged seizures can lead to

a variety of adverse effects on memory and behavior (Nadler, 1981; Holmes, 1997; Kim et al., 2001; McCabe et al., 2001; Holmes et al., 2002; Holmes et al., 2005).

Several reports using animal models suggest epilepsy and undernourishment are related to each other (Taber et al., 1980; Bronzino et al., 1986; Bronzino et al., 1990; Gietzen et al., 1996; Palencia et al., 1996). However, a direct relationship between has not been established yet. Besides, few experimental studies evaluated undernourishment and seizures concerning memory deficit and none of them showed a direct interaction of these conditions over cognition (Huang et al., 2003; Akman et al., 2004).

As food deprivation and epilepsy are both common in developing countries (Hackett & Iype, 2001), it is interesting to determine whether food deprivation during early development exacerbates seizure-induced damage. Considering the epidemiological importance of undernourishment and epilepsy on cognitive aspects we decided to analyze whether undernourishment and seizures interact to modify their functional effects in the rat's developing brain. In this experiment we evaluate the effect of food deprivation initiated shortly after birth on seizure susceptibility, brain and body weight as well as on spatial learning and memory following recurrent seizures and induction of status epilepticus. To properly evaluate spatial learning and memory, we used the Morris water maze that has often been used in the validation of rodent models for neurocognitive disorders. Spatial learning in general and Morris water maze performance in particular appear to depend upon the coordinated action of different brain regions and neurotransmitter systems constituting a functionally integrated neural network (D'Hooge & De Deyn, 2001).

Methods

The experiments were conducted under conditions approved by the Scientific and Research Ethics Committees of the Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) regarding animal welfare. Pregnant female Wistar rats from our breeding colony were maintained on a 12-hour dark-light cycle with food and water freely available. The day of birth was counted as P0. After delivery, each dam with the litter was housed individually. Each litter was culled to 10 pups. The litters were randomly allocated in to six groups, using only male pups (NC: Nourished Control (n=12); NRS: Nourished Recurrent Seizures (n=12); NSE: Nourished Status Epilepticus (n=12); UC: Undernourished Control (n=12); URS: Undernourished Recurrent Seizures (n=17); USE: Undernourished Status Epilepticus (n=12).

Flurothyl-induced seizures: Flurothyl [bis (2,2, 2-trifluoroethyl) ether] (99% min.) is a volatile convulsive agent that rapidly stimulates the central nervous system (CNS), inducing generalized seizures (Truitt et al., 1960; Vélisková et al., 1996). Animals were challenged with flurothyl (20 µL/min constant flow rate) in an air-tight chamber (9.38 L). Animals from NRS and URS groups were submitted to 3 exposures of flurothyl per day (1 hour inter-exposure interval) from P2 to P4. Each exposure was carried out until appearance of the first clonic seizure. Immediately after that, the animals were returned to their home cages. Rats from NSE and USE groups were submitted to status epilepticus under exposure to flurothyl at P15. The time to the first clonic seizure was recorded to calculate seizure threshold. After the experiment, the animals were returned to their original litters. Between exposures, the chamber was flushed with vacuum and room air.

Undernourishment paradigm: The undernourishment paradigm consisted of limiting the offspring's access to nutrition by removing the dams from the cage starting at P2. The deprivation period was increased by 2 hours for 6 consecutive days, from 2 hours on P2 to 12 hours on P7. The deprivation period remained at 12 h/d for the next 8 days (P8 to P15). During deprivation, pups remained in a heated cage, with body temperature maintained at approximately 34°C. After the deprivation period, the pups were housed with their respective dams. Age-matched control rats remained with their dams. Body weights were measured daily, from P2-P30.

Training in the spatial version of the Morris water maze: All experimental groups were trained in the spatial version of the Morris water maze from P21 to P25. The maze was a black circular pool (100-cm in diameter) conceptually divided in 4 equal imaginary quadrants for the purpose of data analysis. The water temperature was 24°C. One and a half cm beneath the surface of the water and hidden from the rat's view was a black circular platform (8 cm in diameter). It had a rough surface, which allowed rats to climb onto it easily. The swimming path of the animals was recorded using a video camera mounted above the center of the pool and analyzed using a video tracking and analysis system. The water maze was located in a well-lit white room with several posters and other distal visual stimuli hanging on the walls to provide spatial cues. A curtain separated the water maze room from the room where the computer was setup and where the animals were temporarily housed during the behavioral sessions. Training in the hidden platform (spatial) version of the Morris water maze was carried out during 5 consecutive days as previously described (Rossato et al., 2006). On each day rats received 4 consecutive training trials during which the hidden platform was kept in a constant location. A different starting location was used on each trial, which consisted of a swim followed by a 60-s

platform sit. Any rat that did not find the platform within 60 s was guided to it by the experimenter. The intertrial interval was 30 s. During the intertrial interval, rats were carefully dried with a towel by the experimenter.

Memory retention was evaluated in a 60-s probe trial carried out in the absence of the escape platform 24 h after the last training session. Data (latency to reach the platform, distance traveled, average swimming speed and time spent in each quadrant) were analyzed using one-way or multi-way ANOVA followed by pos-hoc tests, as appropriate.

At P30 animals were sacrificed with an overdose of thiopental sodium (0,3ml/100g, i.p.). The brains were weighted in a digital scale.

Statistical analysis: Data from the seizure susceptibility experiments were analyzed by Student's t test. Two-way ANOVA was used to analyze body and brain weights. Two- and three-way ANOVA were utilized to analyze spatial memory retention and acquisition, respectively. Values are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was defined as $P < 0,05$ for all tests.

Results

Body weight

As expected the mean body weight gain between P2 and P15 was lower in undernourished (UC, URS and USE groups; 11.9 ± 0.2 g) than in nourished animals (NC, NRS and NSE groups; 17.8 ± 0.2 g; $F_{1, 71} = 362.26$ $p < 0.001$). In the same way, body weight gain was lower in rats submitted to recurrent seizures from P2 to P4 (URS and NRS groups; 14.6 ± 0.3 g) or to status epilepticus at P15 (USE and NSE groups; 13.6 ± 0.3 g) than in control animals (UC and NC groups; 16.3 ± 0.3 g; $F_{2, 71} = 25.25$ $p < 0.001$). Two-way ANOVA analysis indicates an interaction between undernourishment and seizures ($F_{2, 71} = 10.70$ $p < 0.001$). Figure 1.

Brain weight

Figure 2 shows that the brain weight at P30 was lower in undernourished (UC, URS and USE groups; 1.26 ± 0.20 g) than in nourished animals (NC, NRS and NSE groups; 1.38 ± 0.20 g; $F_{1, 71} = 53.63$ $p < 0.001$). However, brain weight was not different among control animals (NC and UC groups; 1.32 ± 0.14 g) and rats submitted to either recurrent seizures from P2-P4 (NRS and URS groups; 1.32 ± 0.13 g), or to status epilepticus at P15 (NSE and USE groups; 1.32 ± 0.14 g; $F_{2, 71} = 0.02$ $p = 0.972$). Two-way ANOVA analysis indicates an interaction between undernourishment and seizures ($F_{2, 71} = 9.85$ $p < 0.001$).

Seizure susceptibility

Student's t test analysis revealed no difference on the mean time to seizure onset between nourished (NC, NRS and NSE groups; 7.45 ± 0.37 min) and undernourished rats (UC, URS and USE; 7.88 ± 0.41 min).

Morris Water Maze

Figure 3 (A) shows the mean escape latencies to the hidden platform during the five days of training in the Morris water maze. Multi-factorial ANOVA analysis indicates that the escape latency decreased in all experimental groups as training progressed ($F_{3,5; 247,3} = 116.5$ $p < 0,001$). Nevertheless, this reduction was more evident in nourished than in undernourished animals ($F_{1; 71} = 14.0$ $p < 0,001$) and in seizure-free animals than in animals submitted to recurrent seizures or to a single status epilepticus ($F_{2;71} = 9.6$ $p < 0,001$). The analysis indicates no interaction between undernourishment and seizures ($F_{2; 71} = 2.42$ $p = 0,096$). As can be seen in Figure 3 (B), undernourished rats spent less time in the target quadrant (UC, URS and USE groups; $23.4 \pm 1.7\%$) than nourished animals (NC, NRS and NSE groups; $32.7 \pm 1.7\%$) ($F_{1; 69} = 15.33$ $p < 0,001$) during a probe test performed at P26 (i.e. 1 day after the last Morris water maze training session). In the same way, rats submitted to recurrent seizures (URS and NRS groups; $26.7 \pm 1.9\%$) and rats submitted to status epilepticus (USE and NSE groups; $23.0 \pm 2.0\%$) spent less time in the target quadrant than seizure-free animals (UC and NC groups; $34.5 \pm 2.1\%$) ($F_{2; 69} = 7.57$ $p = 0,001$). There was a significant interaction between undernourishment and seizure ($F_{2; 69} = 4.62$ $p = 0,013$).

Discussion

In this report we present evidence showing that undernourishment from post-natal day 2 (P2) to 5 (P15) reduces body and brain weight gain and impairs spatial memory without affecting the threshold for seizures in the flurothyl model. However, we also found that although undernourishment and seizures have an additive detrimental effect on body weight and learning, the brain weight of malnourished epileptic animals is higher than that of undernourished non-epileptic rats.

It has been shown that animals undernourished “in utero” or during the lactation period, are more susceptible to the development of seizures at adulthood (Taber et al., 1980; Bronzino et al., 1986; Bronzino et al., 1990; Gietzen et al., 1996; Palencia et al., 1996). In the same way, malnourished adult rats are more vulnerable to kainate- and kindling-induced seizures (Dobbing et al., 1971; Dobbing, 1976; Sarkisian et al., 1997). Our findings indicated that nourished and undernourished rats were equally susceptible to flurothyl-induced status epilepticus. Although flurothyl is a reliable agent to elicit convulsions this discrepancy was also reported in previous studies with similar model (Nunes et al., 2000; Nunes et al., 2002).

We decided to use flurothyl in our experiment because, different from other convulsant agents, it is not able of causing spontaneous seizures, something that could complicate the interpretation of behavioral experiments in the Morris water maze.

We found no difference in brain weight, on P30, among animals who suffered seizures. As opposed to the suggestion (Wasterlain, 1976), that it is not malnutrition, but rather the occurrence of repeated seizures during critical developmental periods what causes a reduction in brain weight, among the undernourished rats, those that suffered seizures presented higher brain weight than those who did not. However, the brain weight of undernourished rats was still lower than that of nourished animals. We believe that brain

edema secondary of the deleterious association between undernourishment and seizures might be responsible for these results. In fact, several clinical and experimental reports indicate that seizures and nutritional deficits are responsible for neuronal and brain edema (Carlton & Kelly, 1969; Seitelberger et al., 1990; Andrew & McVicar, 1994; Almonte et al., 1999; Fountain, 2000; Chan et al., 2004; Briellmann et al., 2005).

There was an interaction between undernourishment and seizures concerning impairment of spatial memory retention at P26. As far as we know, ours is the first report showing this interaction. Earlier reports showed that undernourishment and epilepsy impair the memory in experimental animals (Jordan et al., 1981; Huang et al., 2003; Majak & Pitkänen, 2004). Nevertheless, a direct interaction between undernourishment and epilepsy had never been described before. From P2 to P15, undernourished rats gained less body weight than nourished rats, as expected. These data prove that the undernourishment paradigm employed is effective in reducing animal body weight besides a short period of food deprivation (14 days) (Nunes et al., 2002). The model used in the current study was designed to mimic the early childhood undernourishment that is known to be related to long term mental deficits in children (Grantham-McGregor, 1995). It is important to remember that the way that we evaluated undernourishment (i.e. by measuring body weight) is similar to the clinical way of assessing undernourishment in human beings. A possible complication for the interpretation of our results is that maternal deprivation may have other effect besides food restriction, in particular those induced by stress (Huang et al., 2002; Genest et al., 2004). However, a possible effect of stress due this separation could also be extrapolated to a situation of malnutrition in human beings.

At P30, undernourished rats presented lower brain weight than nourished. Clinical reports indicate that when an organism suffers a nutritional insult, the brain is protected in detriment of other body organs (Hales & Barker, 1992). However, several reports indicate

that nutritional restriction during gestation, or early after birth, affects the growth of different areas of the brain, causing cerebral asymmetry, altered cortical responses and low brain weight (Soto-Moyano et al., 1993; Nunes et al., 2002; Feoli et al., 2006).

From P21 to P25 (i.e. during the five days of training in the Morris water maze), there was a progressive reduction in platform latency among all animals. That means that all animals learned as training days passed by, because the more the rats learn the less they take to go to the escape platform. Escape latency reduction was more evident among nourished than undernourished rats. The same occurred among seizure-free animals when compared to animals that suffered recurrent seizures or status epilepticus. There was no interaction between undernourishment and seizures during acquisition tests. On P26, during Morris water maze probe test, undernourished rats spent less time in the target quadrant than nourished animals. In the same way, rats that suffered recurrent seizures or status epilepticus spent less time in the target quadrant than control animals. As mentioned above, there was an interaction between undernourishment and seizures in the percentage of time spent in the target quadrant. The Morris water maze is a test of hippocampus-dependent spatial memory (Morris, 1984), the closest parallel to episodic memory in humans (Jeltsch et al, 2001). The testing procedure used during the 5 days of locating the hidden platform provides a measure of spatial reference memory, while the probe test ,at P26, is a measure of the strength of spatial learning.

Several clinical and experimental reports show cognitive and behavioral disturbances as well as learning and memory injury after undernourishment or epilepsy (Nunes et al., 1999; Guardiola et al., 2001; Huang et al., 2003; Akman et al., 2004; Hoffmann et al., 2004; Majak & Pitkänen, 2004). Nevertheless, this is the first experiment that shows an interaction between undernourishment and seizures concerning cognitive injury in the rat.

This interaction means a communication, a relation between these conditions worsen memory retention.

To conclude, our findings show that undernourishment and seizures have a detrimental additive effect on body and brain weight as well as in spatial learning and memory processing.

Acknowledgements

The study was supported by grants from FAPERGS and CNPq (05/2247.6 and 478065/2006-0). MH and MPM were supported by scholarships from CAPES.

We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

References

- Almonte RA, Heath DL, Whitehall J, Russell MJ, Patole S, Vink R (1999) Gestational magnesium deficiency is deleterious to fetal outcome. *Biol Neonate*. 76: 26-32.
- Akman C, Zhao Q, Liu X, Holmes GL (2004) Effect of food deprivation during early development on cognition and neurogenesis in the rat . *Epilepsy Behav*. 5: 446–454.
- Andrew RD, MacVicar BA (1994) Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience*. 62: 371-383.
- Baillet LL, Turk WR (2000) The impact of childhood epilepsy on neurocognitive and behavioral performance: a prospective longitudinal study. *Epilepsia*. 41: 426-431.
- Bronzino JD, Austin-La France RJ, Chester JS, Morgane PJ (1986) Effect of protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioral measures. *Brain Res*. 384: 348-354.
- Bronzino JD, Austin-La France JR, Morgane PJ (1990) Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. *Brain Res*. 515: 45-50.
- Briellmann RS, Wellard RM, Jackson GD (2005) Seizure-associated abnormalities in epilepsy: evidence from MR imaging. *Epilepsia*. 46: 760-766.
- Carlton WW, Kelly WA (1969) Neural lesions in the offspring of female rats fed a copper-deficient diet. *J Nutr*. 97: 42-52.
- Chan H, Butterworth RF, Hazell AS (2004) Primary cultures of rat astrocytes respond to thiamine deficiency-induced swelling by downregulating aquaporin-4 levels. *Neurosci Lett*. 366: 231-234.
- Costa JC, Nunes ML, Fiori RM (2001) Seizures in the neonatal period. *J Pediatr (Rio J)*. 77: S115-S122.
- D’Hooge R, De Deyn, PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev*. 36: 60–90.

- Dobbing J, Hopewell JW, Lynch A (1971) Vulnerability of developing brain. *Exp Neurol.* 32: 439-447.
- Dobbing J (1976) Malnutrition et développement du cerveau. *Recherche.* 7: 139-146.
- Erickson M, Zetterstrom R (1979) Neonatal convulsions: incidence and causes in the Stockholm area. *Acta Paediatr Scand.* 68: 807-811.
- Feoli AM, Siqueira IR, Almeida L, Tramontina AC, Vanzella C, Sbaraini S, Schweigert ID, Netto CA, Perry ML, Gonçalves CA (2006) Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition.* 22: 160-165.
- Fountain NB (2000) Status epilepticus: risk factors and complications. *Epilepsia.* 41: S23-S30
- Franzon RC, Oliveira LS, Guerreiro CAM (2004) Estado de mal epiléptico na infância. In Moura-Ribeiro MV, Ferreira LS (org) *Condutas em neurologia infantil*, Unicamp, Editora Revinter, São Paulo, pp. 66-72.
- Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2004) Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *J Physiol.* 554: 543-557.
- Gietzen DW, Dixon KD, Truong BG, Jones AC, Barret JA, Washburn DS (1996) Indispensable amino acid deficiency and increased seizure susceptibility in rats. *Am J Physiol.* 271: R1-R7.
- Grantham- Mc Gregor, S (1995) A review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development. *J Nutr.* 125: S2233-S2238S.
- Guardiola A, Egewarth C, Rotta NT (2001) Avaliação do desenvolvimento neuropsicomotor em escolares de primeira série e sua relação com o estado nutricional. *J Pediatr (Rio J).* 77: 189-196.

Hales CN, Barker DJP (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 35:595–601.

Hackett R, Iype T (2001) Malnutrition and childhood epilepsy in developing countries. *Seizure*. 10:554-558.

Hoffmann AF, Zhao Q, Holmes GL (2004) Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the “two-hit hypothesis”. *Epilepsy Behav*. 5:873-877.

Holmes GL (1997) Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia*. 38:12-30.

Holmes GL, Yang Y, Liu Z, Cermak JM, Sarkisian MR, Stafstrom CE, Neill JC, Blusztajn JK (2002) Seizure-induced memory impairment is reduced by choline supplementation before or after status epilepticus. *Epilepsy Res*. 48:3–13.

Holmes GL (2005) Effects of seizures on brain development: lessons from the laboratory. *Pediatr Neurol*. 33:1-11.

Huang LT, Holmes GL, Lai MC, Hung PL, Wang CL, Wang TJ, Yang CH, Liou CW, Yang (2002) Maternal deprivation stress exacerbates cognitive deficits in immature rats with recurrent seizures. *Epilepsia*. 43:1141–1148.

Huang LT, Lai MC ,Wang CL, Wang CA, Yang CH, Hsieh CS, Liou CW, Yang SN (2003) Long –term effects of early-life malnutrition and status epilepticus: assessment by spatial navigation and CREB serine133 phosphorylation. *Brain Res Dev Brain Res*. 145:213-218.

Ivanovic DM, Leiva BP, Perez HT, Inzunza NB, Almagia AF, Toro TD, Urrutia MS, Cervilla JO, Bosch EO (2000) Long-term effects of severe undernutrition during the first year of life on brain development and learning in Chilean high-school graduates. *Nutrition*. 16:1056-1063.

- Jeltsch H, Bertrand F, Lazarus C, Cassel JC (2001) Cognitive performances and locomotor activity following dentate granule cell damage in rats: role of lesion extent and type of memory tested. *Neurobiol Learn Mem.* 76:81–105.
- Jordan TC, Cane SC, Howells KF (1981) Deficit in spatial memory performance induced by early undernutrition. *Dev Psychobiol.* 14:317-325.
- Kim JJ, Lee HJ, Hnag JS, Packard MG (2001) Amygdala is critical for stress induced modulation of hippocampal long term potentiation and learning. *J Neurosci.* 21:5222-5228.
- Liu RS, Lemieux L, Bell GS, Sisodiya SM, Bartlett PA, Shorvon SD, Sander JW, Duncan JS (2005) Cerebral damage in epilepsy: a population-based longitudinal quantitative MRI study. *Epilepsia.* 46:1482-1494.
- Lombroso CT (1996) Neonatal seizures: historic notes and present controversies. *Epilepsia.* 37:S5-S13.
- Majak K, Pitkänen A (2004) Do seizures caused irreversible cognitive damage? Evidence from animal studies. *Epilepsy Behav.* 5:S35-S44.
- McCabe BK, Silveira DC, Cilio MR, Cha BH, Liu X, Sogawa Y, Holmes GL (2001) Reduced neurogenesis after neonatal seizures. *J Neurosci.* 21:2094-2103.
- Morgane PJ, Moklera DJ, Gallera JR (2002) Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev.* 26: 471–483
- Morris R (1984) Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11:47–60.
- Moshé SL (1993) Seizures in the developing brain. *Neurology.* 43:S3-S7.
- Nadler JV (1981) Desensitization- like changes in GABA receptors binding of rat fascia dentate after entorhinal cortex lesion. *Neurosci Lett.* 26:275-281.

- Nunes ML, Teixeira GC, Fabris I, Gonçalves RA (1999) Evaluation of the nutritional status in institutionalized children and its relationship to the development of epilepsy. *Nutr Neurosci.* 2:139-145.
- Nunes ML, Liptáková S, Velísková J, Sperber EF, Moshé SL (2000) Malnutrition increases dentate granule cell proliferation in immature rats after status epilepticus. *Epilepsia.* 41:S48-S52.
- Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistella V (2002) Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats. *J Pediatr (Rio J).* 78:39-44.
- Palencia G, Calvillo M, Sotelo J (1996) Chronic malnutrition caused by a corn-based diet lowers the threshold for pentylenetetrazole induced seizures in rats. *Epilepsia.* 37:583-586.
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Lima RH, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2006) On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neuroscience.* 143:15-23.
- Rotta LN, Schmidt AP, Mello e Souza T, Nogueira CW, Souza KB, Izquierdo IA, Perry ML, Souza DO (2003) Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem Res.* 28: 1181– 1186.
- Sarkisian MR, Tandon P, Liu Z, Yang Y, Hori A, Holmes GL, Stafstrom CE (1997) Multiple kainic acid seizures in the immature and adult brain: ictal manifestations and long-term effects on learning and memory. *Epilepsia.* 38:1157-1166.
- Schoneit B, Haensel P (1988) Neurohistologic studies of cortical pyramidal neurons in the rat following rehabilitation of early postnatal malnutrition. *J Hirnforsch.* 29:599-615.
- Seitelberger F, Lassmann H, Hornykiewicz O (1990) Some mechanisms of brain edema studied in a kainic acid model. *Acta Neurobiol Exp.* 50:263-267.

- Sharma SK, Behari M, Maheshwari MC, Selvamurthy W (1990) Seizure susceptibility & intrarectal sodium valproate induced recovery in developing undernourished rats. *Indian J Med Res.* 92:120-127.
- Soto-Moyano R, Hernandez A, Perez H, Ruiz S, Carreno P, Belmar J (1993) Functional alterations induced by prenatal malnutrition in callosal connections and interhemispheric asymmetry as revealed by transcallosal and visual evoked responses in the rat. *Exp Neurol.* 119:107-112.
- Stern WC, Forbes WB, Resnick O, Morgane PJ (1974) Seizure susceptibility and brain amine level following protein malnutrition during development in the rat. *Brain Res.* 79:375– 384.
- Taber KH, Fuller GN, Stanley JC, De France JF, Wiggins RC (1980) The effects of postnatal undernourishment on epileptiform kindling of dorsal hippocampus. *Experientia.* 36:69-70.
- Truitt EB, Ebesberg EM, Ling ASG (1960) Measurement of brain excitability by use of hexafluorodiethyl ether (Indoclon). *J Pharmacol Exp Ther.* 129:445-453.
- Velísková J, Velíšek L, Nunes ML, Moshé S (1996) Developmental regulation of regional functionality of substantia nigra GABA A receptors involved in seizures. *Eur J Pharmacol.* 309:167-173.
- Wasterlain CG (1976) Developmental effects of seizures: role of malnutrition. *Pediatrics.* 57:197-200.

Legends of Figures

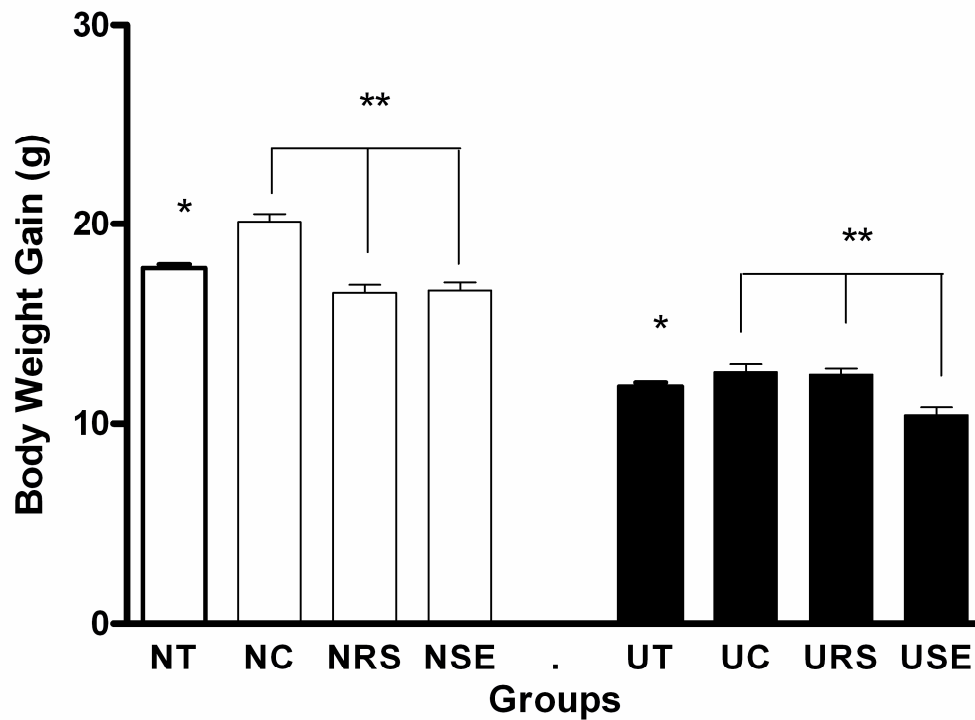


Figure 1- Comparison of body weight gain among nourished total (NT), nourished control (NC), nourished recurrent seizures (NRS), nourished status epilepticus (NSE) undernourished total (UT), undernourished control (UC), undernourished recurrent seizures (URS) and undernourished status epilepticus (USE) groups, between P2 and P15, in Wistar rats. Effect of undernourishment in body weight gain ($*P_{\text{[undernourishment]}} < 0,001$). Effect of seizure in body weight gain ($**P_{\text{[seizure]}} < 0,001$). Interaction undernourishment x seizure ($P_{\text{[undernourishment x seizure]}} < 0,001$)

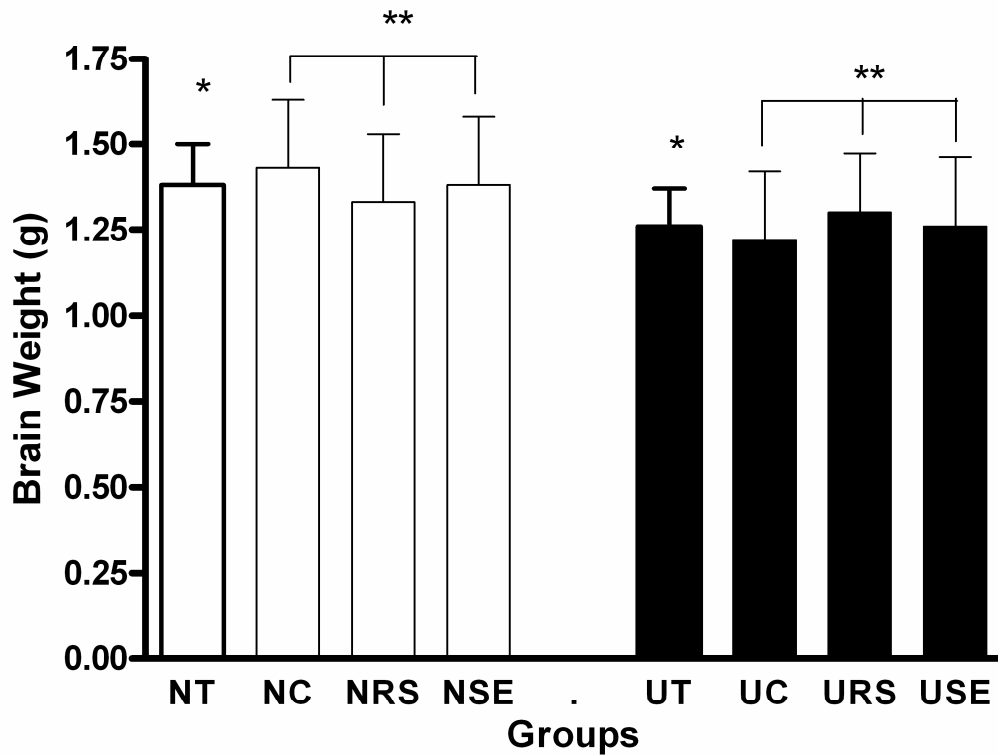
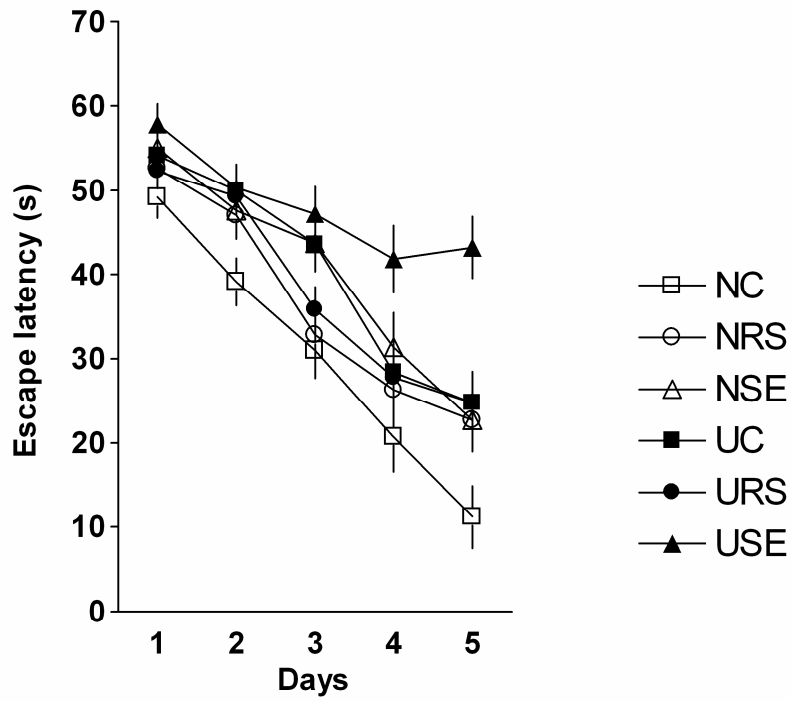
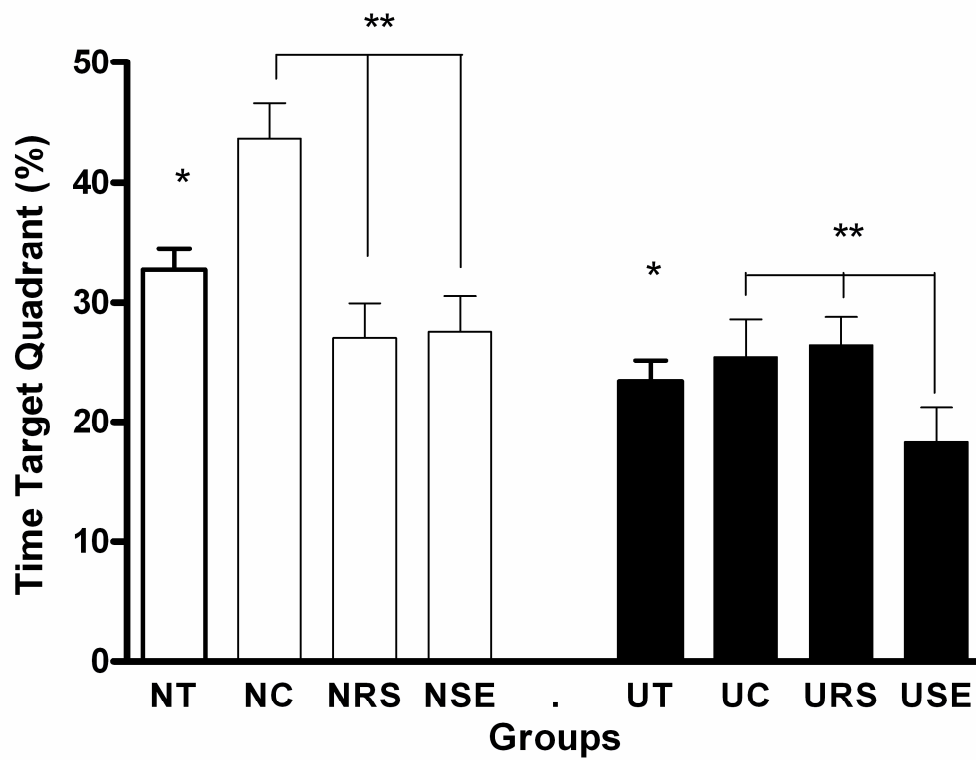


Figure 2- Comparison of brain weight among nourished total (NT), nourished control (NC), nourished recurrent seizures (NRS), nourished status epilepticus (NSE) undernourished total (UT), undernourished control (UC), undernourished recurrent seizures (URS) and undernourished status epilepticus (USE) groups, in P30, in Wistar rats. Effect of undernourishment in brain weight ($*P_{\text{[undernourishment]}} < 0,001$). Effect of seizure in brain weight ($**P_{\text{[seizure]}} = 0,972$). Interaction undernourishment x seizure ($P_{\text{[undernourishment x seizure]}} < 0,001$).



(A)



(B)

Figure 3- Comparison of the performance on the MWM task among nourished total (NT), nourished control (NC), nourished recurrent seizures (NRS), nourished status

epilepticus (NSE) undernourished total (UT), undernourished control (UC), undernourished recurrent seizures (URS) and undernourished status epilepticus (USE) groups. (A) Acquisition Test. The mean escape latencies do the hidden platform in MWM as a function of day. Effect of undernourishment in escape latency ($P_{[\text{undernourishment}]}$ <0,001). Effect of seizure in escape latency ($P_{[\text{seizure}]}$ <0,001). Interaction undernourishment x seizure ($P_{[\text{undernourishment} \times \text{seizure}]}$ <0,096). (B) Probe Test. The percentage of time spent in the target quadrant where the platform was located during acquisition test were NT 32,7±1,7%; NC 43,7±2,9%; NRS 27,0±2,9%; NSE 27,6±2,9; UT 23,4±1,7; UC 25,4±3,2; URS 26,4±2,4; USE 18,3±2,9. Effect of undernourishment in the percentage of time spent in the target quadrant ($*P_{[\text{undernourishment}]}$ <0,001). Effect of seizure in the percentage of time spent in the target quadrant ($**P_{[\text{seizure}]}$ =0,001). Interaction undernourishment x seizure ($P_{[\text{undernourishment} \times \text{seizure}]}$ =0,013).